



Aplicaciones terapéuticas de un aceite de oliva rico en sustancias biológicamente activas en el síndrome metabólico.

Memoria presentada por D. Enrique Jurado Ruiz para optar
al grado de Doctor.

Sevilla, Mayo 2017

La Directora de la Tesis,

El Codirector de la Tesis,

El doctorando,

Dr. Francisco Martín Bermudo

Dra. Genoveva Berna Amoros

D. Enrique Jurado Ruiz

I. INTRODUCCIÓN.....	5
1. Enfermedades metabólicas asociadas a la alimentación.....	6
1.1 Obesidad.	6
1.1.1 Tejido adiposo: estructura, clasificación y distribución.....	6
1.1.2 Función del tejido adiposo.....	7
1.1.3 Remodelación del tejido adiposo en la obesidad.	9
1.2 Diabetes Mellitus tipo 2.	10
1.2.1 Prevalencia.	10
1.2.2 Función de la insulina.	11
1.2.3 Resistencia a la insulina.	13
1.3 Síndrome metabólico.	14
1.3.1 Prevalencia.	16
1.4 Enfermedad de hígado graso no alcohólico.	17
1.4.1 Prevalencia.	17
1.4.2 Desarrollo de EHGNA.....	17
2. Fisiopatología de las enfermedades metabólicas.	18
3. Aceite de oliva.	21
3.1 Obtención y Tipos de aceites de oliva.	21
3.2 Composición química del aceite de oliva.	22
4. Efectos beneficiosos del consumo de aceite de oliva.....	23
4.1 El aceite de oliva en la prevención de enfermedades cardiovasculares.	24
4.2 El aceite de oliva en la mejora de la diabetes tipo 2.	26
4.3 El aceite de oliva en la mejora de la obesidad.	27
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
2. Hipótesis de partida.....	31
2.1 Objetivo general.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
3.1 Diseño del modelo experimental y obtención de muestras.	34
3.1.1 Animales de experimentación.	34
3.1.2 Composición de las dietas hipercalóricas e hiperlipídicas.	35
3.1.3 Obtención de muestras animales.	41
3.1.4 Obtención de sangre de la cola.	41
3.1.5 Extracción de tejidos.....	42
3.1.5.1 Extracción cardiaca.	42
3.1.5.2 Extracción hepática.	42
3.1.5.3 Extracción pancreática.	42
3.1.5.4 Extracción del tejido adiposo epididimal.	42
3.1.5.5 Extracción del tejido adiposo subcutáneo.	43
3.1.5.6 Extracción del tejido adiposo marrón.	43
3.2 Páncreas y homeostasis de la glucosa.....	43
3.2.1 Determinación de la homeostasis de la glucosa y la secreción de insulina.	43
3.2.2 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (IPGTT).	43
Protocolo.....	43
3.2.3 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa midiendo insulina en plasma.....	44

Protocolo.....	44
3.2.4 Test de tolerancia intraperitoneal a la insulina (IPITT).	44
Protocolo.....	44
3.2.5 Obtención de islotes de Langerhans por el método de la collagenasa.	45
3.2.6 Incubaciones estáticas.	46
3.2.7 Contenido de insulina.	46
3.3 Determinación del perfil lipídico plasmático.....	47
3.3.1 Medida de colesterol total.....	47
3.3.2 Determinación del colesterol HDL.	47
Principios del análisis.	47
Protocolo.....	48
3.3.3 Determinación de triglicéridos.....	48
Principios del análisis.	48
Protocolo.....	48
3.4 Lipidómica hepática.	49
3.4.1 Extracción de los lípidos totales en hígado.	49
3.4.2 Separación de fracciones lipídicas por extracción en fase sólida (SPE).	49
Principios.....	49
Protocolo.....	50
3.4.3 Metilación de ácidos grasos.....	50
3.4.4 Análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos.	51
3.5 Determinación del estado inflamatorio y parámetros hormonales.....	51
3.5.1 Extracción de citoquinas del tejido adiposo.	51
3.5.2 Test ELISA para parámetros inflamatorios y hormonales.....	52
3.5.2.1 Protocolo del análisis de la citoquina TNF- α en tejido adiposo.	52
3.5.2.2 Protocolo del análisis de la citoquina IFN- γ en tejido adiposo.....	52
3.5.2.3 Protocolo del análisis de la citoquina IL-6 en tejido adiposo.	53
3.5.2.4 Protocolo del análisis de la insulina en plasma.	53
3.5.2.5 Protocolo del análisis de leptina en plasma.	53
3.5.3 Inmunoensayo de marcadores inflamatorios por multiplex.	53
Principio del análisis.....	53
Protocolo experimental.	54
3.6 Análisis de expresión de genes.....	54
3.7 Histología.	56
3.7.1 Inclusión de muestras en criostato y procesamiento.	56
3.7.2 Inclusión de muestras en parafina y procesamiento.	56
3.7.3 Tinción con hematoxilina-eosina (H&E).....	57
Principios.....	57
Protocolo.....	57
3.7.4 Tinción rojo sirio.	57
Principio.	57
Protocolo.....	57
3.7.5 Cuantificación muerte adipocitaria.	58
3.7.6 Cuantificación de apoptosis en cortes histológicos de páncreas.....	58
3.7.7 Cuantificación del tamaño de los adipocitos.	58
3.7.8 Tinción rojo oleoso.	59
Principio.	59
Protocolo.....	59
3.7.9 Semicuantificación de esteatosis en el hígado.	59

3.8 Inmunohistoquímica.	59
3.8.1 Inmunohistoquímica F4/80.....	59
3.8.2 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).	60
Principios del análisis.	60
Protocolo.....	60
3.9 Proteómica hepática.	61
3.9.1 Separación del extracto proteico.....	61
3.9.2 Selección de proteínas.....	62
3.9.3 Tripsinización y separación cromatografía.	62
3.9.4 Ingenuity pathway analysis (IPA).	63
3.10 Análisis estadístico.	63
3.9.1 Análisis estadístico en proteómica.	63
4.1 Desarrollo del modelo experimental y evolución de las muestras.	66
4.1.1 Evolución de peso corporal.	66
4.1.2 Peso de los órganos extraídos.	67
4.1.2.1 Peso de la grasa subcutánea.	67
4.1.2.2 Peso de la grasa epididimal.....	68
4.1.2.3 Peso del corazón.	68
4.1.2.4 Peso del hígado.	69
4.2 Homeostasis de la glucosa.	70
4.2.1 Medida de glucosa en sangre.	70
4.2.2 Test de tolerancia a la glucosa.....	70
4.2.3 Medida de insulina en plasma.	72
4.2.4 Test de resistencia a la insulina.	73
4.2.5 Test de tolerancia a la glucosa midiendo insulina.	74
4.2.6 Test de tolerancia a la insulina.	76
4.2.7 Estímulo secreción de insulina y contenido de insulina.	78
4.2.8. Estudios de apoptosis en los islotes pancreáticos.	81
4.3 Perfil lipídico y medición de hormonas.	83
4.3.1 Medida y determinación de colesterol.....	83
4.3.2 Leptina.	85
4.4 Determinación del estado inflamatorio.	86
4.4.1 Parámetros inflamatorios plasmáticos.	86
4.4.2 Parámetros inflamatorios en el tejido adiposo subcutáneo.....	88
4.4.3 Parámetros inflamatorios en el tejido adiposo epididimal.....	90
4.4.4 Expresión de marcadores de inflamación en macrófagos del tejido graso epididimal. ...	92
4.5 Estudios en tejido adiposo.	94
4.5.1 Tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo y epididimal.	94
4.5.2 Infiltración de macrófagos en el tejido adiposo subcutáneo y epididimal.	98
4.6 Estudios en tejido hepático.	99
4.6.1 Expresiones de genes reguladores del metabolismo lipídico.	99
4.6.2 Estudios histológicos hepáticos.	101
4.6.3 Estudios de lipidómica.	103
4.6.4 Estudios de proteómica y análisis de las rutas de señalización.	107
V. DISCUSIÓN.	113
VI. CONCLUSIONES.	130
VII. BIBLIOGRAFÍA.	132

I. INTRODUCCIÓN.

1. Enfermedades metabólicas asociadas a la alimentación.

Se ha comprobado que una alimentación rica en calorías y en grasas de origen animal contribuye al desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles como el Síndrome Metabólico (SM), la Diabetes Méllitus tipo 2 (DM2) y la enfermedad de hígado graso no alcohólica (HGNA).

1.1 Obesidad.

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por un acúmulo excesivo de grasa corporal (>25% en hombres y >33% en mujeres) que puede ser perjudicial para la salud (Referencia). Aunque el acumulo excesivo de grasa se debe a un balance positivo de energía (ingesta energética mayor que el gasto energético) su origen es multifactorial, en el que intervienen múltiples factores tanto ambientales como genéticos. (Lecube A, et al. 016). Prevalencia.

1.1.1 Tejido adiposo: estructura, clasificación y distribución.

A nivel histológico el tejido adiposo está formado por los adipocitos, rodeados por un estroma de tejido conectivo muy vascularizado e innervado, que además contiene macrófagos, fibroblastos, preadipocitos y otros tipos de células (Weisberg et al, 2003).

El tejido adiposo se puede clasificar según su localización topográfica en tejido adiposo subcutáneo, distribuido entre la dermis y la aponeurosis y fascia de los músculos, y tejido adiposo interno, que comprende el tejido adiposo visceral, distribuido dentro del tórax, abdomen y pelvis, y tejido adiposo interno no visceral, localizada en el músculo (Shen et al, 2003).

En los individuos obesos, la acumulación de grasa se distribuye en diferentes zonas. Según la zona predominante de acumulación se distingue distintos tipos de obesidad: i) obesidad tipo androide, donde la grasa se acumula mayoritariamente en la región abdominal; ii) obesidad tipo ginoide, la grasa se acumula en el segmento inferior (zona glúteo-femoral) y, iii) obesidad

homogénea, donde el exceso de grasa está distribuida sin que predomine en ningún área anatómica concreta. De los tres tipos de obesidad la obesidad androide es la que tiene mayor riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas y vasculares. (Salas-Salvadó et al, 2007).

1.1.2 Función del tejido adiposo.

El tejido adiposo fue considerado durante mucho tiempo como un reservorio de energía en forma de lípidos, pero en la última década se ha reconocido el importante papel de este en la homeostasis de energía corporal, la sensibilidad a la insulina, y el metabolismo de los hidratos de carbono y lípidos. Se considera actualmente como un tejido endocrino, paracrino y autocrino, ya que produce y secreta una amplia variedad de moléculas llamadas adipocitoquinas, con una gran actividad biológica que pueden actuar a nivel del sistema nervioso central, del músculo, del hígado, del hueso, y de otros muchos tejidos (Friedman, 2000). Entre las adipocitoquinas más importantes secretadas por el tejido adiposo destacan:

- **Adiponectina (adipoQ):** Citosina producida exclusivamente por los adipocitos. La adiponectina además de aumentar la secreción de insulina y mejorar la sensibilidad en los tejidos periféricos (Okamoto et al, 2008), tiene efectos sobre el sistema nervioso central que afectan a la ingesta de alimentos y el gasto energético (Kubota et al, 2007). Existen numerosos estudios en humanos en los que determinan que los niveles bajos de adiponectina se asocian fuertemente con la resistencia a la insulina, el aumento de la adiposidad corporal, DM2 y SM (Rabe et al, 2008; Kondo et al, 2002; Lindsay et al, 2002). La adiponectina también tiene acción antiinflamatoria, suprimiendo la expresión de TNF- α e IL-6 y los efectos anti-aterogénicos, disminuyendo los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y TG pro-aterogénicas pequeñas y densas (Rabe et al, 2008).
- **Leptina:** es otra de las adipocinas importantes producidas por los adipocitos, ejerce efectos sobre la regulación de la ingesta de alimentos, el gasto energético y el equilibrio energético de todo el cuerpo tanto en roedores, como en humanos. La expresión y secreción de leptina está altamente correlacionada con la masa grasa corporal y el tamaño de los adipocitos (referencia).

La leptina también está implicada en la regulación del metabolismo de la glucosa (Morton et al, 2005), estimula la oxidación de AG en el hígado, el páncreas y el músculo esquelético (Buettner et al, 2008). Además de sus efectos sobre el metabolismo de los lípidos y la glucosa, la leptina afecta al sistema inmunitario, al aumentar la producción de citoquinas inflamatorias y estimular la proliferación de células T (Rasouli et al, 2008).

- **Resistina:** es una hormona peptídica producida por el adipocito blanco. Parece ser que está aumentada en los modelos de roedores obesos, está altamente asociada con la resistencia a la insulina y la DM2 en modelos animales (Referencia). La resistina activa SOCS-3, que inhibe la fosforilación de IR y las proteínas de señalización aguas abajo, lo que conduce a la alteración de la señalización de insulina (Steppan et al, 2005). También inhibe la captación de glucosa por el músculo esquelético y el hígado y mejora la gluconeogénesis hepática (Banerjee et al, 2004).
- Citoquinas asociadas al sistema inmune y a la respuesta inflamatoria como son:
 - i) **El Factor de necrosis tumoral α (TNF- α):** Es una citoquina que además de ser producida normalmente por los macrófagos en estados de inflamación, también es sintetizada por el tejido adiposo y muscular (Referencia). Sus efectos biológicos incluyen anorexia, disminución de peso corporal, inducción de saciedad, y reducción del tejido adiposo mediante la estimulación de la lipólisis e inhibición de la expresión de lipoprotein lipasa y GLUT4 (elementos claves para la acumulación de lípidos); por tanto, los niveles del TNF- α en el tejido adiposo están correlacionados positivamente con el tamaño de los depósitos grasos.
 - ii) **Interleuquinas IL-10, IL-6** con carácter proinflamatorio.
- Angiotensina, el inhibidor de la activación del plasminógeno-1 (PAI-1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), moléculas relacionadas con la función hemovascular.

1.1.3 Remodelación del tejido adiposo en la obesidad.

El exceso de energía, tras un balance energético positivo, se acumula en forma de TG en el tejido adiposo subcutáneo, que va aumentando por la diferenciación y proliferación de los preadipocitos. Cuando se rebasa el umbral de almacenamiento de grasa por el tejido adiposo subcutáneo, se produce el almacenamiento en la grasa visceral y por lo tanto su aumento, que al tener menor capacidad adipogénica crece por hipertrofia, aumentando el tamaño de los adipocitos. (Laforest et al, 2015). Estudios en animales de experimentación y en humanos constataron que en las primeras etapas de expansión del tejido adiposo por hipertrofia se producen zonas de hipoxia (zonas pobres de oxígeno), provocando muerte celular de adipocitos periféricos y una alteración de la expresión de las adipocitoquinas secretadas por el tejido adiposo (Sun et al, 2011; Hosogai et al, 2007).

Por otro lado, el aumento del tejido adiposo visceral conlleva a una activación de los macrófagos localizados en el tejido adiposo (macrófagos tipo M2, que secretan citoquinas antiinflamatorias) a macrófagos M1 con carácter proinflamatorio (que secretan citoquinas proinflamatorias) y a una infiltración masiva de macrófagos M1 que juegan un papel crucial en la respuesta inflamatoria en la obesidad. Como consecuencia, la proporción de macrófagos del tejido adiposo aumenta del 10% al 40% del total de células (Weisberg et al., 2003). Estos macrófagos secretan sustancias proinflamatorias como el TNF- α , IL-6 e IL-10 (Weisberg et al, 2003; Harford et al, 2011) implicadas en la resistencia a la insulina en los adipocitos a través de la vía de señalización de esta. (Lumeng et al. 2008). Por lo tanto, la población de macrófagos M1 es mayoritaria en el tejido adiposo obeso expresando una serie de factores proinflamatorios y correlacionándose positivamente con la resistencia a la insulina (Heilbronn et al, 2008).

Un aumento del tejido adiposo por hipertrofia genera hipoxia y muerte celular de los adipocitos periféricos, la transformación de los macrófagos M2 (secretadores de adipocitoquinas antiinflamatorias) a macrófagos M1 (secretadores de adipocitoquinas proinflamatorias) y la infiltración de estos en el tejido adiposo, produciendo una alteración de la homeostasis debido a un aumento de las adipocitoquinas proinflamatorias (aumento de IL-6, IL-10 y TNF- α) y un descenso

de adipoquinas antiinflamatorias (disminución de adipoQ) en el tejido adiposo (Tilg et al, 2006).

1.2 Diabetes Mellitus tipo 2.

Según la asociación norteamericana de diabetes (ADA) la DM es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracteriza por hiperglucemia producida por defectos en la secreción de insulina, en la acción de la mismo o en ambas, que conlleva a alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. A largo plazo, la hiperglucemia crónica de la DM se asocia con la disfunción y fallo de varios órganos, principalmente en los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 2015).

Según el origen de la hiperglucemia la DM se clasifica en cuatro tipos: i) DM tipo 1, producida por una destrucción de la célula B con deficiencia absoluta de insulina; ii) DM tipo 2, producida por una insulinoresistencia, alteraciones en la secreción de insulina o ambas; iii) DM gestacional, diagnosticada exclusivamente en el embarazo y; iv) Otras diabetes que van desde defectos genéticos en genes concretos a trastornos del páncreas u otras patologías diversas (American Diabetes Association, 2015).

La DM2 conocida como “diabetes no insulino dependiente” o diabetes del adulto, es la más frecuente, constituye el 90-95% de todas las diabetes, y está relacionada con el estilo de vida y la obesidad abdominal. Presenta una marcada predisposición genética, la cual es muy compleja y modulada por factores externos como son la nutrición, la actividad física, la etnia, la malnutrición intrauterina, entre otros.

1.2.1 Prevalencia.

La DM2 es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y en vías de desarrollo y su prevalencia va en aumento. Se considera uno de los problemas sanitarios más grave de nuestro tiempo. Los cálculos más recientes de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) indican que hay 415 millones de adultos entre 20-79 años con diabetes en el mundo, de

los cuales 193 millones están sin diagnosticar (Atlas de la DIABETES de la FID. Séptima Edición 2015)

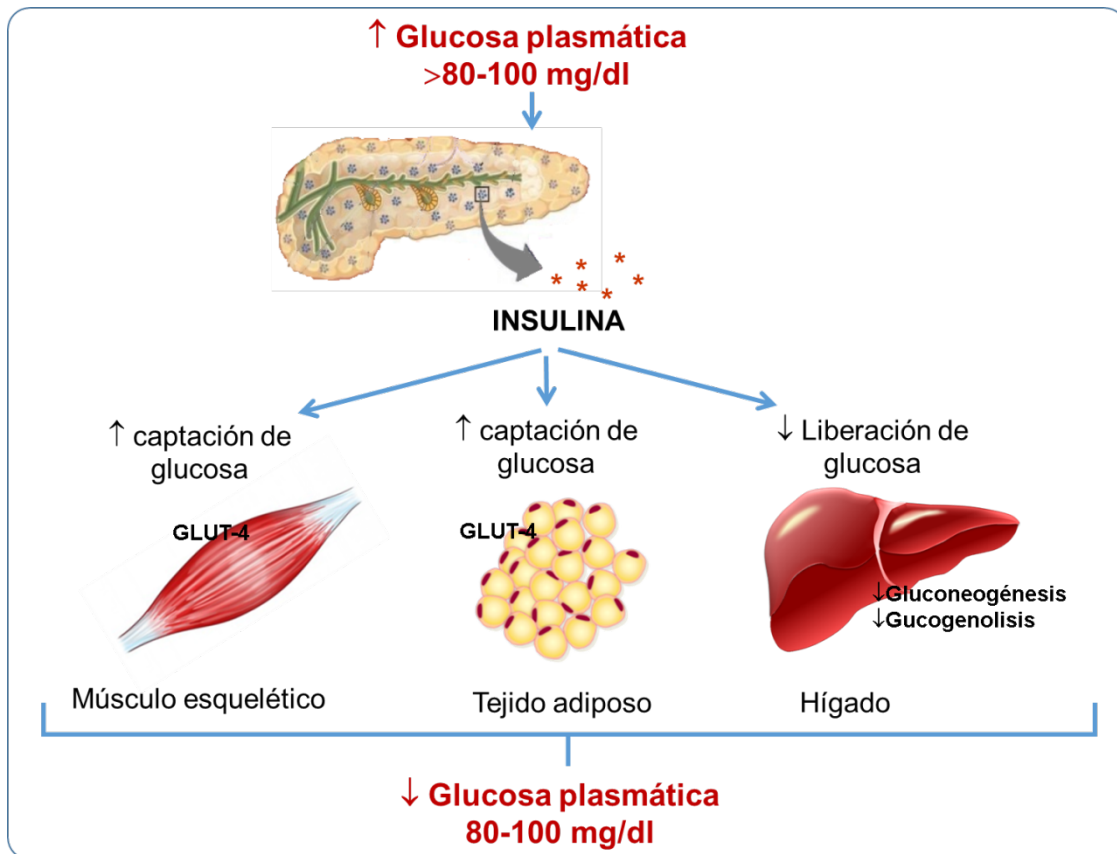
El número de personas con diabetes tipo 2 está aumentando rápidamente en el mundo. Este aumento está asociado con el envejecimiento de la población, el desarrollo económico, el aumento de la urbanización, las dietas menos saludables (ricas en azúcares simples y en grasas) y la disminución de la actividad física.

En España, según el estudio di@bet.es, la prevalencia de DM es de 13,8%, de los cuales se estima que el 90-95% son tipo 2 (Soriguer et al, 2012).

Entre los factores de riesgo destacan la obesidad, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia e hipo-HDL (Soriguer et al, 2012).

1.2.2 Función de la insulina.

La insulina es una de las hormonas más importantes en el metabolismo. Es secretada por las células β pancreáticas en respuesta al aumento de los niveles de glucosa circulante, como sucede en el estado postprandial (justo después de una comida), aunque también ejercen su influencia aminoácidos, cetonas, diversos nutrientes, péptidos gastrointestinales y neurotransmisores. La insulina actúa en los tejidos periféricos disminuyendo las concentraciones plasmáticas de glucosa mediante: i) una mayor captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo y, ii) la supresión coordinada de la producción de glucosa hepática a partir de aminoácidos y otros intermedios del metabolismo (gluconeogénesis) y a partir del glucógeno (glucogenolisis). Para que se produzca una mayor captación de glucosa en el músculo y en el tejido adiposo, la insulina aumenta la movilización del transportador de glucosa dependiente de insulina (GLUT4) de las vesículas intracelulares de almacenamiento a la superficie celular, aumentando con ello la captación de glucosa (Karnieli et al, 1981). La expresión de GLUT4 se correlaciona con la sensibilidad a la insulina y aumenta con el ejercicio (Karnieli, et al, 2008).



Además de su efecto sobre la captación de glucosa, la insulina también está implicada en el metabolismo lipídico en el tejido adiposo. Actúa inhibiendo la lipólisis en el tejido adiposo a través de la inhibición de la lipasa sensible a hormonas, una enzima que media la hidrólisis de los triglicéridos (TG) en AGL y glicerol, y activando la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo, una enzima que hidroliza TG presente en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y partículas de quilomicrones a AGL, mediando su posterior captación en las células. La insulina también promueve la adipogénesis y la diferenciación del tejido adiposo mediante la estimulación del receptor activado por proliferadores de peroxisomas- γ (PPAR γ).

La función de la insulina se lleva a cabo mediante la unión con su receptor específico (IR; receptor de insulina), localizado en las membranas plasmáticas de las células diana. Una vez que la insulina interacciona con su receptor en los tejidos diana, éste es activado, una molécula de fosfato se combinará con el aminoácido tirosina. Esto va a poder seguir diferentes cascadas de señalización.

Principalmente hay dos vías de transducción activadas por la acción de la insulina:

- Vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K): metabolismo de la glucosa y de los lípidos.
- Vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas): regulación en la síntesis de proteínas.

1.2.3 Resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina (RI) se define como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos, como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo (Fabbrini et al., 2013).

A través de sus complejas cascadas de señalización, la insulina regula el metabolismo de la glucosa y la grasa. En condiciones de resistencia a la insulina, la señalización y la acción de la insulina están comprometidas. Bajo condiciones de resistencia a la insulina, se produce una hiperglucemia, una alteración del metabolismo lipídico (menor captación de AG por el tejido adiposo y mayor liberación de AGL), del metabolismo proteico (menor absorción de los AA y menor síntesis proteica), de la regulación de la función endotelial, de la estimulación del crecimiento y de la proliferación celular, o de la expresión de numerosos genes reguladores de estas diferentes funciones (“Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes”, 2015). La hiperglucemia en la resistencia a la insulina conlleva a una hiperinsulinemia compensadora, que se ha vinculado al mayor riesgo de aterogénesis y enfermedad macrovascular en el SM (o de RI) (Gaggini et al., 2013).

La resistencia a la insulina es crucial para el desarrollo de la hiperglucemia y la DM2. Los defectos en la acción de la insulina hacen que disminuya la supresión de la producción de glucosa por parte del hígado y del riñón y haya una menor captación y metabolismo de dicho carbohidrato en tejidos sensibles a la insulina como el músculo y la grasa corporal. En individuos normales, la ingestión de glucosa, aminoácidos y AGs conduce a la secreción de insulina de las células β pancreáticas. Inmediatamente después de la ingestión, la insulina se libera, alcanzando su máximo en 10 minutos y desapareciendo en aproximadamente

20 minutos. Esta respuesta insulínica de primera fase inhibe la producción de glucosa hepática y mejora la captación de glucosa por los tejidos. La segunda respuesta insulínica sigue, comenzando a los 15-20 minutos y alcanzando su máximo en 20-40 minutos (LeRoith et al, 2002). En los individuos resistentes a la insulina, existe una respuesta anormal de las células β a la glucosa, dando como resultado una pérdida inicial de la respuesta insulínica de primera fase, seguida por una respuesta aumentada de segunda fase que conduce a hiperinsulinemia. Por lo tanto, la hiperglucemia crónica da lugar a niveles basales aumentados de insulina, pero disminuye la respuesta de las células β a la estimulación de la glucosa (115. Gallagher et al, 2010). Además, los AGL también aumentan los niveles basales de insulina; Sin embargo, a altas concentraciones inhiben la liberación de insulina de la célula β en respuesta a la glucosa. Así, estos fenómenos conocidos respectivamente como glucotoxicidad y lipotoxicidad median la disfunción de las células β en la resistencia a la insulina (Muoio et al, 2008). El aumento de la demanda de insulina resulta en el estrés del retículo endoplasmático y la muerte celular.

La glucotoxicidad y la lipotoxicidad conducen a la progresión de la resistencia a la insulina a la prediabetes y a la DM2 manifiesta. Muchas de las complicaciones de la DM2, a saber, las enfermedades macrovasculares, como las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades microvasculares, como la retinopatía, la neuropatía y la neuropatía, pueden atribuirse a hiperglucemia prolongada y, por lo tanto, el riesgo de estas condiciones puede comenzar en la fase pre-diabética (Grundy et al, 2012).

1.3 Síndrome metabólico.

El Síndrome Metabólico (SM) es una agrupación de varios factores de riesgo de origen metabólico que condicionan un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y Diabetes Mellitus Tipo 2 (DT2) (Kaur, 2014). Gerald Reaven, en 1988 fue el primero en describir el SM, denominándolo “síndrome X” sugiriendo que la resistencia a la insulina constituía el mecanismo fisiopatológico básico (Reaven, 1988; 1993).

A lo largo de los años se han ido modificando los criterios de diagnóstico del SM para lograr una definición clara y concisa que pueda ser aplicada a cualquier

individuo del mundo, teniendo en cuenta las diferencias étnicas, y poder determinar su riesgo de ECV y DT2 y para permitir la realización de estudios epidemiológicos comparativos (Lam and LeRoith, 2015). Los criterios de diagnóstico se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de SM según la definición armonizada propuesta por la IDF, la NHLBI, la AHA, la Federación Mundial del Corazón y la Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad. Presentar tres factores de los cinco citados.

Parámetro de medida	Valores
Perímetro de cintura	Específicos de cada país
Nivel de Triglicéridos	>150 mg/dl o tratamiento farmacológico
Nivel de colesterol HDL	< 40 mg/dl en varones y < 50 mg/dl en mujeres o tratamiento farmacológico
Hipertensión	Presión sistólica \geq 130 mmHg; Presión diastólica \geq 85 mmHg o tratamiento farmacológico
Niveles de glucosa en ayunas	\geq 100 mg/dl o tratamiento farmacológico

En esta nueva definición, la obesidad se diagnostica usando la circunferencia de la cintura y no el IMC, ya que se ha demostrado que la circunferencia de la cintura se correlaciona mejor con la adiposidad visceral y la resistencia a la insulina, así como con el desarrollo de DT2 y CVD (Alberti et al, 2005). Además, en la definición actual, se utilizan valores de corte de circunferencia de cintura específicos de etnias, ya que se ha demostrado que ciertos grupos étnicos, especialmente las poblaciones de Asia meridional, tienen mayores grados de adiposidad visceral que los europeos (Lear et al, 2008).

No obstante, aun con todos los esfuerzos para unificar los criterios para el diagnóstico de SM, en la actualidad, no existe un criterio unitario que lo defina, además se cuestiona la utilidad del SM como herramienta de diagnóstico o de

gestión y que los nuevos intentos de redefinirlos son inadecuados a la luz del conocimiento y la comprensión actuales (Simmons et al, 2010). A pesar de las diferentes opiniones, el diagnóstico de SM se sigue utilizando en la práctica clínica, así como en el ámbito de la investigación (Lam and LeRoith, 2015).

1.3.1 Prevalencia.

La prevalencia mundial de SM se sitúa entre el 10% y el 84%, según la región, el entorno urbano o rural, la composición (sexo, edad, raza y etnia) de la población estudiada y la definición del síndrome utilizado (Desroches & Lamarche, 2007). En general, la IDF estima que una cuarta parte de la población adulta del mundo tiene el SM ("The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome"). El mayor nivel socioeconómico, el estilo de vida sedentario y el alto índice de masa corporal (BMI) están asociados significativamente con SM. Cameron y colaboradores han llegado a la conclusión de que las diferencias en los antecedentes genéticos, la dieta, los niveles de actividad física, el tabaquismo, los antecedentes familiares de diabetes y la educación influyen en la prevalencia del SM y sus componentes (Cameron, Shaw, & Zimmet, 2004). La prevalencia observada de SM en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NHANES) fue de 5% entre los sujetos de peso normal, 22% entre el sobrepeso y 60% entre los obesos (Park et al., 2003). Además, aumenta con la edad (10% en individuos de 20 a 29 años, 20% en individuos de 40 a 49 años y 45% en individuos de 60 a 69 años) (Ford, Giles, & Dietz, 2002).

La prevalencia de SM (basada en los criterios NCEP-ATP III, 2001) varió de 8% a 43% en hombres y de 7% a 56% en mujeres de todo el mundo (Cameron et al., 2004) Park y colaboradores (Park et al., 2003) notificaron que hay un aumento en la prevalencia de SM desde los 20 años de edad hasta la década de los 60 para hombres y de 70 para mujeres. La mayor prevalencia entre mujeres es en la posmenopausia, que varía de 32,6% a 41,5% (Ponholzer, Temml, Rauchenwald, Marszalek, & Madersbacher, 2008).

Un informe de Framingham Heart Study indicó que el aumento de peso es uno de los determinantes más importantes en la prevalencia del SM. Así, un aumento de peso de $\geq 2,25$ kg durante un período de 16 años se asoció con hasta un 45%

mayor de riesgo de desarrollar el SM, y se ha demostrado por Palaniappan et al. que cada aumento de 11 cm en la circunferencia de la cintura se asocia con un 80% mayor de riesgo de desarrollar el síndrome en un plazo de 5 años. Las alteraciones metabólicas ocurren simultáneamente más frecuentemente de lo que se esperaría por casualidad y la concurrencia de varios factores aumenta el riesgo cardiovascular más allá del riesgo asociado con los factores individuales sólo (Reilly & Rader, 2003). El riesgo aumenta con el número de componentes presentes SM (Andreadis et al., 2007).

1.4 Enfermedad de hígado graso no alcohólico.

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es una afección caracterizada por deposición excesiva de grasa (más del 5% en peso) en ausencia de consumo excesivo de alcohol (158. Szczepaniak et al, 2005). La EHGNA se considera como una manifestación hepática del síndrome metabólico, y ha surgido como una de las principales consecuencias de la mal nutrición de los países desarrollados. La primera etapa de EHGNA se caracteriza por esteatosis, acumulación de grasa en el hígado que puede progresar a un estado clínico grave caracterizado por la aparición de inflamación con o sin fibrosis y puede conducir a cirrosis, hepatocarcinoma, e insuficiencia hepática. (Scorletti et al, 2011).

1.4.1 Prevalencia.

El HGNA afecta entre el 15 y el 30% de la población general y entre el 70 y el 90% en las personas con obesidad o DM2, lo que sugiere una conexión entre la obesidad, la resistencia a la insulina y el HGNA (Birkenfeld et al., 2011; Camporez et al., 2013).

1.4.2 Desarrollo de EHGNA.

Los mecanismos moleculares por los cuales se produce y progresa el EHGNA no están claros. Actualmente se acepta que en la patogénesis y progresión de la EHGNA están implicados factores nutricionales, mecanismos genéticos y

epigenéticos, cambios en la microbiota intestinal, resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y las citoquinas secretadas por el tejido adiposo.

El hígado desempeña un papel fundamental en el metabolismo lipídico, captando los AGL del plasma, que pueden ser utilizados como fuente energética, mediante la β -oxidación, ser almacenados en forma de TAG o ser exportados en las lipoproteínas (VLDL) a los tejidos periféricos.

Cuando se produce un desequilibrio entre el aflujo, la oxidación y la exportación de lípidos, se produce la acumulación hepática de TAG (Buzzetti et al, 2016).

La afluencia de AGL al hígado como consecuencia de la pérdida de inhibición de la lipasa sensible a hormonas en la resistencia a la insulina, produce una resistencia a la insulina a nivel hepático al inhibir el papel represor de la insulina en la gluconeogénesis, dando como resultado una gluconeogénesis hepática aumentada. La glucosa formada se destina a la lipogénesis hepática y acumulación de TG en el hígado. El aumento de AGL en el hígado conduce a un aumento de la β -oxidación mitocondrial y la producción de radicales libres, aumentando la cantidad de ROS y citoquinas inflamatorias. Esto puede resultar en daño mitocondrial, y con la consiguiente acumulación de grasa hepática y HGNA (Byrne et al, 2010).

Existe una asociación entre el diagnóstico de HGNA y mayor incidencia de ECV (Targher et al, 2007). Se piensa que el HGNA aumenta la resistencia a la insulina y la dislipidemia lo que conduce a una sobreproducción de TG, lo que lleva a la aterosclerosis. Además, el aumento de ROS y estado proinflamatorio aumenta la aterogénesis (Targher et al, 2007b).

2. Fisiopatología de las enfermedades metabólicas.

Son muchos los factores que contribuyen al desarrollo de enfermedades metabólicas. La genética, el estilo de vida (como la dieta y la actividad física), la obesidad y la resistencia a la insulina desempeñan un papel determinante. La resistencia a la insulina junto con la obesidad se considera como los mecanismos principales en el desarrollo de las enfermedades metabólicas. Actualmente, se considera a la obesidad como el factor determinante de la resistencia a insulina. En un estado de obesidad, el tejido adiposo, sobre todo el tejido visceral, es muy

activo en la liberación de sustancias como ácidos grasos libres (AGL) y de niveles anormales de adipocinas que pueden resultar en el establecimiento de resistencia a la insulina contribuyendo de esta forma a las enfermedades metabólicas (Gallagher et al, 2011). No obstante, el origen fisiopatológico de estas enfermedades aún está en discusión, existiendo controversias entre si es la RI o la obesidad abdominal el origen del conjunto de anormalidades metabólicas que conlleva a las múltiples patologías, como DM2, SM y/o EHGNA. Los ácidos grasos no esterificados o ácidos grasos libres (AGL) son liberados abundantemente a partir de la masa total de tejido adiposo (Wree et al., 2014), para ser utilizado por los tejidos. La utilización de los AGL es rápida con una vida media plasmática alrededor de 2-4 min. Randle y colaboradores observaron que las elevadas concentraciones de AGL se asociaban con muchos efectos metabólicos indeseables, y uno de ellos es la RI (Karpe et al, 2011). Además, bajo condiciones de resistencia a la insulina, se reducen los efectos inhibidores de la insulina sobre la lipólisis, lo que conduce a un aumento adicional de los AGL. Por lo tanto, el aumento de los AGL no sólo es un resultado de la resistencia a la insulina, sino también una causa, creando así un círculo vicioso.

La resistencia a la insulina generada por los AGL es debida a múltiples mecanismos que incluyen entre otros el ciclo Randle, la acumulación de derivados lipídicos intracelulares tales como diacilglicerol y ceramidas, señales inflamatorias, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.

La primera evidencia de la participación de los AGL en la menor captación de glucosa en los tejidos diana fue propuesta en 1963 por Randle y colaboradores (Randle et al, 1963). Propusieron una conexión entre la resistencia a la insulina y concentraciones elevadas de AGL, de tal manera que el aumento de los AGL plasmáticos conlleva a una mayor oxidación de estos por los tejidos que conducen a un aumento del contenido intracelular de glucosa y a una disminución de la captación de esta por los tejidos.

Posteriormente, estudios realizados con infusiones de lípidos para aumentar los niveles de AGL plasmáticos tanto en humanos como en roedores demostraron una reducción de la absorción y metabolismo de la glucosa estimulado por la insulina. Esta resistencia a la insulina iba paralela a la acumulación de AG en el hígado y en el músculo.

El aumento de los AGL plasmáticos puede superar la capacidad del tejido adiposo para absorber y almacenar AGL. Cuando esto ocurre, los AGL se acumulan en tejidos con capacidad limitada para el almacenamiento de lípidos, como es el caso del hígado y del músculo esquelético. Este fenómeno se conoce como deposición ectópica de grasa y está fuertemente asociado con la resistencia a la insulina (Yki-Jarvinen, 2002). Los ácidos grasos se acumulan en los miocitos como derivados de ácidos grasos. De estos derivados de ácidos grasos, el diacilglicerol (DAG), y las ceramidas se correlacionan directamente con la resistencia a la insulina.

Por otro lado, los AGL aumentan las vías de señalización inflamatoria a través de la interacción directa con miembros de la familia del receptor Toll-like (TLR) de los macrófagos activando la secreción de citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y las interleucinas (IL) IL-1 β y IL-6 (Shi et al., 2006). Las concentraciones elevadas de AGL aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS, además de afectar a diversas estructuras celulares debido a su reactividad química, también activan vías de señalización proinflamatorias. En el tejido adiposo, la exposición al estrés oxidativo produce una disminución de la adiponectina (Soares et al, 2005). Los niveles aumentados de ROS alteran la señalización de la insulina, generando resistencia a la insulina (Tangvarasittichai et al, 2015).

La disfunción mitocondrial es la alteración en el número, densidad o función de las mitocondrias de un tejido/célula. Se ha demostrado que existe una conexión entre la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina en el músculo esquelético. En estudios realizados en obesos, individuos resistentes a la insulina, así como individuos con DM2 demuestran que el musculo esquelético presenta menor número de mitocondrias y menor tamaño y con menor expresión de los genes implicados en la fosforilación oxidativa mitocondrial, el proceso mediante el cual las mitocondrias producen energía en forma de ATP (Hojlund et al, 2008; Kim et al, 2008). El aumento de la captación de AGL y su oxidación incompleta también ha sido implicado en la mediación de la disfunción mitocondrial en el músculo esquelético en condiciones resistentes a la insulina (Koves et al, 2008). Además, la disfunción mitocondrial conduce a un aumento del estrés oxidativo y la formación de ROS, que disminuye aún más la masa mitocondrial y la función.

3. Aceite de oliva.

El aceite de oliva se considera históricamente, como un alimento insustituible en los pueblos de la cuenca mediterránea. A los romanos debemos palabras como “oleum”, que significa aceite, y de los árabes andalusíes tomamos la palabra árabe “az-zait”, que quiere decir “el jugo de la oliva” (Sánchez-Muniz, 2007). Es la forma de denominar un producto natural que se obtiene por presión de la aceituna.

3.1 Obtención y Tipos de aceites de oliva.

Según el Consejo Oleícola Internacional (COI), el aceite de oliva virgen es aquel que se obtiene únicamente del fruto del olivo (*Olea europaea sativa*) mediante procedimientos mecánicos o físicos en condiciones térmicas especiales, que no produzcan alteraciones del aceite (Lavee, 2015). Tan sólo se contemplan en esta definición procesos de extracción mecánica (procesos de lavado, trituración y molienda, batido de la pasta, decantado, prensado, centrifugado y filtrado). El producto así obtenido, es un zumo natural (al que se le ha quitado el agua) que conserva el sabor, aroma, vitaminas, oligoelementos y características químicas de la aceituna de la que procede.

Los aceites de oliva se clasifican de acuerdo a dos criterios: su puntuación organoléptica (olor, sabor, color y aspecto a 20 °C durante 24 horas) y su acidez libre (expresada en ácido oleico, donde 1° representa 1 gramo por 100 gramos de aceite). Los aceites de oliva virgen, presentan una puntuación organoléptica igual o superior a 6,5 y una acidez menor de 3,5° (Azizian et al., 2015). Si este grado es menor que 1, da lugar al llamado aceite de oliva virgen extra. El aceite de oliva de baja calidad o “lampante” no es apto para el consumo, requiere un proceso de refinación o rectificación completa del cual resulta, sin modificaciones de la estructura glicérida inicial, el aceite de oliva refinado (figura 1). Este aceite puede consumirse tal cual o combinarse con aceite de oliva virgen apto para el consumo (generalmente con aceite de oliva virgen “extra”), para dar lugar al denominado aceite de oliva. Finalmente, el aceite de orujo de oliva es aquel que, se obtiene por tratamiento con disolvente de los restos de pulpa y huesos después de la extracción del aceite de oliva virgen, o bien mediante

centrifugación, a partir del alperujo.

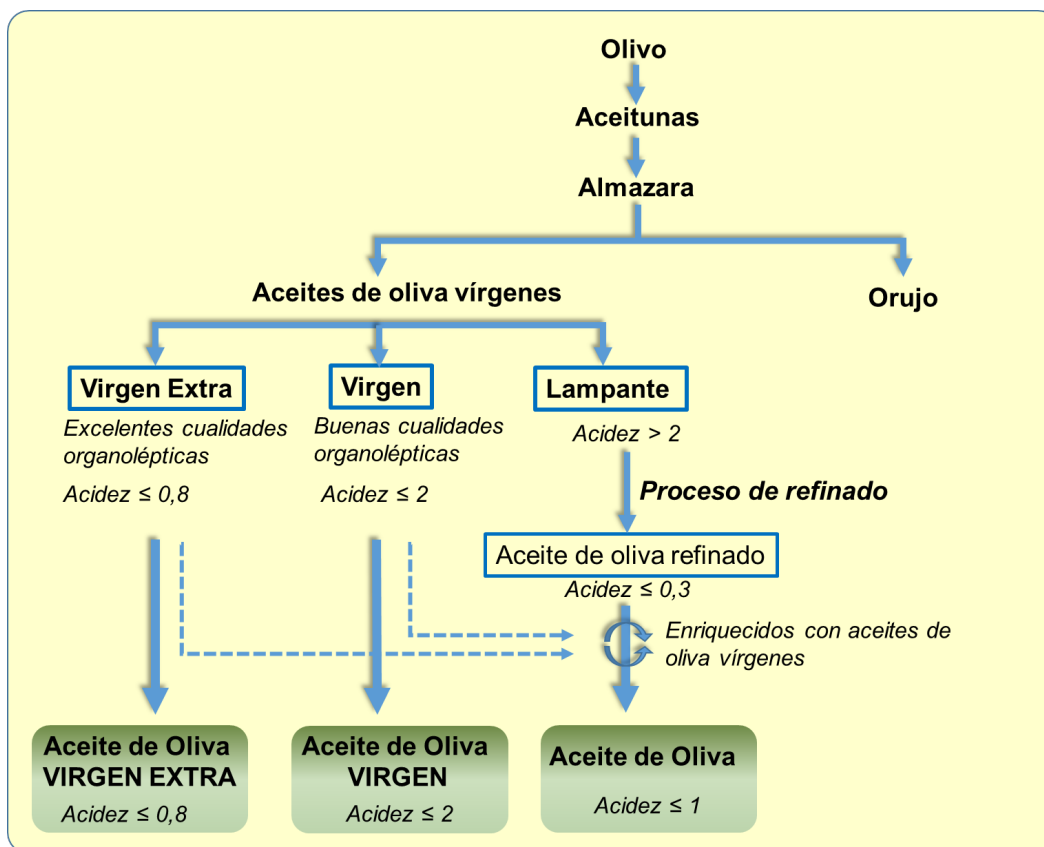


Figura 1: Clasificación de los aceites de oliva vírgenes según los Reglamentos (CE) N° 1989/2003 y (UE) N° 1348/2013

3.2 Composición química del aceite de oliva.

Desde un punto de vista cuantitativo, el aceite de oliva virgen puede clasificarse en dos fracciones: una fracción mayoritaria, que incluye los compuestos saponificables, y una fracción minoritaria constituida por los componentes menores, que incluyen la materia insaponificable, los polifenoles y las ceras.

La fracción mayoritaria constituye un 98-99% del aceite y está formada, principalmente, por triglicéridos (TG) y ácidos grasos libres en cantidades muy pequeñas que condicionan la acidez del aceite. Los TG son ésteres formados, por la combinación de una molécula de glicerol con tres moléculas de ácidos grasos. La abundancia de ácidos grasos monoinsaturados (AGM), concretamente de ácido oleico (18:1, n-9c), es característica del aceite de oliva

y su porcentaje, respecto al total de ácidos grasos del TG, varía entre el 60 y el 84%. La concentración de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) es baja (aproximadamente un 13-15%). El contenido en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) es menor, aunque el ácido linoleico (18:2, n-6) puede estar presente en el aceite en concentraciones que van del 3 al 21%.

Los componentes menores del aceite de oliva virgen (que son la fracción insaponificable y los polifenoles), tienen una gran importancia cualitativa, pues, aunque constituyen sólo el 1-2% del aceite, tienen un alto valor biológico. El insaponificable del aceite de oliva contiene hidrocarburos, entre los que destacan el escualeno y el β -caroteno. Los esteroides también constituyen una parte importante de la fracción insaponificable, principalmente el β -sitosterol que, junto a otros esteroides menores, constituyen hasta el 93% del total de esteroides del aceite de oliva virgen y se les atribuye un efecto hipocolesterolemiante. El aceite de oliva virgen tiene tocoferoles, siendo las cantidades de α -tocoferol muy superiores al contenido de las formas beta, gamma y delta, que actúan como antioxidantes. Además, en el insaponificable del aceite de oliva virgen encontramos los alcoholes triterpénicos eritrodiol y uvaol. Estos compuestos están presentes fundamentalmente en la piel de la aceituna, por ese motivo se encuentran en tan baja proporción en el aceite de oliva virgen, mientras que son muy ricos en el aceite de orujo de oliva (hasta el punto que la determinación de alcoholes triterpénicos se utiliza como uno de los criterios de pureza para diferenciar aceites obtenidos por presión y los obtenidos mediante disolventes). Por último, la fracción de polifenoles es ciertamente importante porque confiere un alto poder antioxidante al aceite de oliva virgen, estabilizándolo frente a la autooxidación; entre estos polifenoles se encuentran ácidos benzoicos y cinámicos, compuestos flavonoides y otros, como la oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol.

4. Efectos beneficiosos del consumo de aceite de oliva.

Las primeras evidencias científicas que sugirieron un papel beneficioso del aceite de oliva en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, se deben a los estudios de Ancel Keys y sus colaboradores. En los años 60, Ancel Keys y su equipo llevaron a cabo el estudio de los siete países, en el que participaban

EE.UU., Finlandia, Grecia, Holanda, Italia, Japón y Yugoslavia, todos ellos con diferentes hábitos alimenticios (Keys & others, 1980). Los resultados de dicho estudio revelaron un bajo índice de enfermedades cardiovasculares en la isla de Creta (Grecia), aun cuando sus habitantes consumían una gran cantidad de grasas en comparación con el resto de los países. La grasa fundamental de la dieta en esta isla era el aceite de oliva, aceite rico en ácido oleico, por lo que la conclusión de este estudio fue que el ácido oleico debía tener un papel protector sobre el sistema cardiovascular.

Desde entonces, son numerosas las evidencias científicas que apuntan a los AGMI, concretamente al ácido oleico del aceite de oliva, como el componente clave de la dieta mediterránea y el responsable de su efecto protector (Covas et al., 2015). Sin embargo, a pesar de los múltiples beneficios atribuidos a los AGMI, son cada vez más los estudios que señalan que el contenido de ácido oleico no puede explicar en su totalidad los beneficios del aceite de oliva virgen sobre la salud (Perez-Jimenez et al, 2007). Así por ejemplo, en estudios realizados con un aceite de girasol alto oleico (con una concentración en ácido oleico similar al aceite de oliva), a diferencia del aceite de oliva virgen, no es capaz de reducir la presión sanguínea de pacientes hipertensos (Ruíz-Gutiérrez, Muriana, Guerrero, Cert, & Villar, 1996).

4.1 El aceite de oliva en la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Según el informe anual del año 2013 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la principal causa de muerte en el mundo es la enfermedad isquémica del corazón y la enfermedad cerebrovascular; estas dos enfermedades cardiovasculares son las responsables de muerte en el mundo más de 12 millones de personas, el 23,2% del total de muertes mundiales.((WHO), 2013).

De todos los factores de riesgo cardiovascular, la hipercolesterolemia y la hipertensión parecen ser los más determinantes. De hecho, una disminución del 10% en los valores de colesterol total en sangre, puede reducir la mortalidad por enfermedad cardiovascular en un 15%. Y una disminución de 5 a 10 mmHg en la presión sanguínea diastólica y de 10 a 20 mmHg en la sistólica, pueden reducir

hasta un 17% los accidentes vasculares en personas hipertensas de alto riesgo (hipertensión severa). Además, la hipercolesterolemia y la hipertensión arterial se encuentran asociadas frecuentemente, presentando un efecto conjunto sinérgico sobre el riesgo cardiovascular.

El Consensus report, Jaen (Spain) 2004 y Córdoba (Spain) 2008 señalaron que en estudios epidemiológicos y clínicos el consumo de una Dieta Mediterránea se asocia a mejoría de los principales factores de riesgo cardiovascular, incluyendo el perfil lipídico, la lipemia postprandial, la presión arterial, el peso corporal, la sensibilidad periférica a la acción de la insulina y el metabolismo de la glucosa y el perfil antitrombótico. Además, dicha dieta modula positivamente la función endotelial, la inflamación y el estrés oxidativo. Algunos de estos efectos se atribuyen a los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen, por lo que en la definición de Dieta Mediterránea debería incluirse la presencia de este aceite. (Perez-Jimenez et al., 2005).

En 2004, la FDA (Food and Drug Administration) americana autorizó la difusión de mensajes saludables sobre el aceite de oliva. En este informe apoyado en 73 ensayos clínicos quedó establecido que el consumo de aceite de oliva mantiene el colesterol HDL y reduce el colesterol LDL, cuando sustituye a una fuente de grasa saturada. Al sustituir los hidratos de carbono en dietas pobres en grasa por AGMI se observa reducción en el colesterol LDL y mantenimiento del colesterol unido a las HDL además de un descenso en los niveles de triglicéridos. La lipemia postprandial es un factor de riesgo aterogénico asociado a cambios oxidativos el cual se ve influenciado por el tipo de grasa de la dieta. Algunos estudios (Abia et al., 2001) demostraron que el consumo de aceite de oliva virgen comparado con el aceite de girasol alto-oleico reduce la respuesta de las lipoproteínas posprandiales. Los quilomicrones que se originan tras la ingesta de aceite de oliva parecen entrar más rápidamente en la circulación y son eliminados de forma más rápida que los originados tras la ingesta de grasa saturada o poliinsaturada.

El mecanismo fisiológico de los efectos hipolipemiantes del aceite de oliva está aún pendiente de ser dilucidado. Se ha propuesto una mejora del transporte reverso de colesterol, una reducción de la absorción intestinal de colesterol y un incremento de la excreción biliar como base fisiológica de la acción.

La confirmación del efecto en el estudio EUROLIVE ha demostrado que los

aceites de oliva ricos en compuestos fenólicos inducen un mayor aumento en los niveles de HDL-c asociado a una reducción del daño oxidativo y del estrés oxidativo. (Hernaez et al., 2015) (de la Torre-Carbot et al., 2010) (Covas et al., 2006).

4.2 El aceite de oliva en la mejora de la diabetes tipo 2.

Los resultados de diversos estudios prospectivos (Salas-Salvado et al., 2011) que han evaluado la asociación entre la composición lipídica de la dieta y el desarrollo de diabetes tipo 2 son, hasta el momento, controvertidos. Así mientras que algunos no encuentran asociación entre los diferentes tipos de ácidos grasos y el riesgo de diabetes (van Dam, Willett, Rimm, Stampfer, & Hu, 2002) otros reportan una asociación inversa entre el consumo de grasa de origen vegetal y el riesgo de diabetes. En este sentido, resultados recientes obtenidos en la cohorte PREDIMED han demostrado que la adscripción a un patrón dietético mediterráneo seguido durante 4 años y caracterizado por un elevado consumo de grasas de origen vegetal disminuía la incidencia de diabetes en personas con elevado riesgo cardiovascular. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que la composición nutricional de la dieta, y en especial los ácidos grasos, es capaz de modificar no únicamente la composición lipídica plasmática sino también la composición lipídica de la membrana celular de plaquetas, eritrocitos y células leucocitarias (Krachler et al., 2008). Además, puesto que la diabetes tipo 2 se considera actualmente como una patología que incluye la inflamación crónica de bajo grado en su base etiopatogénica, y la modificación de la composición lipídica de las membranas celulares, especialmente en las células leucocitarias, se ha demostrado que mediante la dieta es posible modificar uno o más de estos procesos y, por lo tanto, ejercer un efecto modulador destinado a la prevención de la arteriosclerosis y de la trombosis. La hipertrigliceridemia atribuible al incremento de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) es una de las alteraciones metabólicas más frecuentemente asociadas a la diabetes. Numerosos estudios han considerado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ricas en colesterol como las “lipoproteínas aterotrombogénicas”. Sin embargo, estudios recientes indican que las dislipidemias juegan un papel decisivo en el desarrollo de la aterosclerosis y se asocia principalmente al exceso de

producción hepática de grandes VLDL ricas en triglicéridos, niveles bajos de colesterol HDL y altos niveles de colesterol LDL. Todos estos mecanismos implicados en la síntesis y degradación hepática de lipoproteínas en enfermos con Síndrome Metabólico dependen, en gran medida, de la acción de la insulina, de dietas específicas y de la respuesta lipémica postprandial que será mayor cuanto mayor es el tiempo de permanencia de los triglicéridos en sangre (Zazpe et al., 2008).

4.3 El aceite de oliva en la mejora de la obesidad.

La obesidad es una enfermedad crónica con una elevada morbilidad y mortalidad por trastornos cardiovasculares, principal causa de mortalidad mundial, que implica numerosos mecanismos potencialmente tratables como la propia obesidad, la hipertensión, la dislipemia y la diabetes, en el marco del llamado Síndrome Metabólico (SM). (World Health Organization. 2013). De hecho, el alarmante incremento en la prevalencia de diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, y de algunos tipos de cáncer está asociado a las elevadas cifras de sobrepeso y obesidad. (Hossain, Kavar, & El Nahas, 2007). La obesidad y el SM constituyen uno de los trastornos con mayor prevalencia en los países occidentales y, sin duda, se está convirtiendo en la epidemia del siglo XXI, puesto que la mayor parte de los países europeos occidentales presenta una prevalencia en torno al 30 %, y en España esta prevalencia está entre el 25-31%. (Hossain et al., 2007) (Fernández-Bergés et al., 2012)). Uno de los datos más impactantes del SM, es que incrementa entre 2,5-3 veces el riesgo de enfermedad cardiovascular, primera causa de muerte en nuestro país (Fernández-Bergés et al., 2012). Además, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición estima que entre el 7-8% del gasto sanitario en España está relacionado con la obesidad. El importante impacto sobre las enfermedades crónicas, el coste sanitario, la calidad de vida y sus crecientes dimensiones configuran la obesidad como un importante problema de salud pública y un auténtico reto sanitario global, que constituye la segunda causa de mortalidad previsible, superada tan sólo por el consumo de tabaco (James, 2008) Entre las diversas complicaciones asociadas a la acumulación adiposa, destacan por su transcendencia clínica las alteraciones metabólicas y circulatorias, que aumentan notablemente el riesgo

cardiovascular (dislipidemia, diabetes mellitus, hipertensión), y que están especialmente vinculadas a la obesidad, en el marco del SM tanto en adultos como en niños.

Una de las hipótesis más aceptadas establece que la obesidad cursa con un estado inflamatorio crónico que se caracteriza por un incremento de los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias, así como la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo. Estos macrófagos infiltrados generan a su vez gran cantidad de citoquinas (ej: IL-6, TNF- α), actuando como elemento clave entre la obesidad y la patogénesis de la resistencia insulínica en el SM. (Gregor & Hotamisligil, 2011). A su vez, el estado inflamatorio y de estrés oxidativo desarrollado en el tejido adiposo, conlleva a una disfunción de los vasos sanguíneos, caracterizada principalmente por una vasodilatación deteriorada en respuesta a diversos agonistas, y que afecta a la resistencia vascular periférica, el flujo sanguíneo y por tanto a la distribución de metabolitos con las consecuentes alteraciones metabólicas seguidas de hipertensión arterial y aterosclerosis. (Tesauro & Cardillo, 2011). A pesar de los continuos avances en la identificación de los mecanismos moleculares de la obesidad, son escasos los progresos en el desarrollo de terapias eficaces capaces de prevenir o revertir el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones en el SM (Barbarroja et al., 2010). La medicina basada en la evidencia ha demostrado recientemente el beneficio de la adherencia a un patrón de dieta Mediterránea con aceite de oliva como principal fuente de grasa (estudio PREDIMED) en la prevención primaria de enfermedad cardiovascular y el SM. (Ramon Estruch et al., 2006) (Ramón Estruch et al., 2013) Este estudio ha sido el primero realizado a nivel de prevención primaria, y ha demostrado una mejora significativa de la dieta Mediterránea y del aceite de oliva en marcadores de inflamación y de estrés oxidativo, así como sobre la función cardiovascular (Ramon Estruch et al., 2006) (Ramón Estruch et al., 2013) Estos datos son reveladores e indican que las intervenciones dietéticas, hasta la fecha, parecen contribuir favorablemente, incluso mejor que las farmacológicas, en la reducción de la prevalencia del SM. (Ramon Estruch et al., 2006)

Estudios futuros tendrán que dilucidar de forma específica las interacciones entre células endoteliales, de músculo liso y adventiciales en la regulación fisiológica de la función vasoactiva. En condiciones de resistencia a la insulina, el equilibrio

fisiológico entre las vías vasoconstrictora y vasodilatadora en las células endoteliales se desplaza hacia una vasoconstricción predominante, debido a la activación del sistema de endotelina. Además, el deterioro de la función de los adipocitos y la producción de citocinas inflamatorias en el tejido adiposo perivascular conduce a aumentar la producción de ROS y el estrés oxidativo, lo que a su vez aumenta la contractilidad de las células del músculo liso (Campia, Tesauro, & Cardillo, 2012).

Son pocos los trabajos específicos que han estudiado la relación entre los componentes mayoritarios y minoritarios del aceite de oliva y la obesidad, pero no cabe duda que en esta próxima década tendremos una avalancha de trabajos dado el estado actual del tema.

Como conclusión y a la luz de las evidencias recopiladas, está más claro que los efectos beneficiosos para la salud atribuidos al aceite de oliva virgen no se pueden explicar únicamente por su contenido en ácido oleico, ya que sus componentes minoritarios tienen funciones fisiológicas y farmacológicas relevantes. En resumen, entre estos compuestos, los tocoferoles y los compuestos fenólicos pueden mejorar la función endotelial al reducir los niveles de radicales libres y como consecuencia la producción de eicosanoides y moléculas de adhesión. A través de estas moléculas se modularía el reclutamiento de monocitos a las lesiones ateroscleróticas. Otros componentes menos estudiados, como los fitoesteroles y los terpenoides, presentan también efectos antiinflamatorios y vasorrelajantes respectivamente que igualmente condicionan la función cardiovascular y el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. En su conjunto, estos cuatro grupos de compuestos parecen ser responsables de las acciones biológicas del aceite de oliva virgen y en particular de la categoría que denominamos extra.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2. Hipótesis de partida.

Existen numerosos trabajos que evidencian que dietas ricas en grasas, a partir de un 40% de la ingesta calórica, desarrollan síndrome metabólico, DT2 y EHGNA. Por otro lado, diversos estudios señalan que las grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas tienen efectos beneficiosos sobre las enfermedades metabólicas. Esto hace que nos planteemos si una dieta alta en grasas basada en AGMI y compuestos polifenólicos, como es el aceite de oliva virgen extra, puede tener efectos beneficiosos sobre las enfermedades mencionadas a pesar de ser ingeridas en altas cantidades.

2.1 Objetivo general.

Estudiar los efectos sobre los tejidos metabólicamente activos (hígado, tejido adiposo e islotes pancreáticos) de una dieta rica en grasas monoinsaturadas y de compuestos polifenólicos provenientes del aceite de oliva virgen extra.

2.2 Objetivos específicos.

En animales alimentados con HFD basadas en SFA y MUFA (aceite de oliva virgen extra), desde el destete y durante 6 meses se pretende:

- a) Analizar la riqueza en principios activos y la composición molecular de los aceites empleados en el estudio.
- b) Estudiar el efecto sobre el peso y el perfil lipídico.
- c) Comprender las modificaciones que se producen en los mecanismos de regulación de la homeostasis de la glucemia, la función pancreática y la resistencia a la insulina.
- d) Saber el grado de inflamación aguda y crónica que existe a nivel plasmático y en los distintos tipos de tejido adiposo.
- e) Analizar en los tejidos metabólicamente activos (hígado y grasa) los cambios que se producen a nivel: i) histológico/patológico; ii) en el contenido y la síntesis lipídica y iii) en la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo y el daño celular.

- f) Entender los cambios que se producen en el hígado a nivel de la expresión de proteínas y de las adaptaciones metabólicas (metabolitos), más relevantes, relacionadas con el SM y la DM2.
- g) Tratar de dibujar rutas y redes moleculares de señalización que aporten una visión integradora y que permitan explicar la mejora que se produce a nivel fisiopatológico, en animales alimentados con dietas HFD basadas en MUFA (aceite de oliva virgen extra).

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Diseño del modelo experimental y obtención de muestras.

3.1.1 Animales de experimentación.

Los animales usados para toda la experimentación fueron ratones de la cepa C57BL/6J, machos, de 27-33 gramos y 4 semanas de edad, suministrados por Charles Rivers (LesOncins, Francia).

Después de un periodo de aclimatación de 2 semanas, mantenidos en el animalario de CABIMER, se alimentaron durante 12 semanas con dieta estándar o control (C o LFD; n=30) o dieta alta en grasa animal (HFD-L; n= 120).

Tras ese período de tiempo, los ratones HFD-L se redistribuyeron, de forma aleatoria, en los siguientes regímenes alimenticios:

- Seguir con la dieta HFD-L (HFD-L; n=30).
- Revertir a la dieta C. (R; n=30)
- Quitar la grasa animal de la alimentación y sustituirlo por la misma cantidad de grasas, pero procedentes de aceite de oliva virgen extra (HFD-VOO; n=30).
- Quitar la grasa animal de la alimentación y sustituirlo por la misma cantidad de grasas, pero procedentes de aceite de oliva virgen extra Oleaster (HFD-O; n=30).

Los 4 grupos de animales se mantuvieron en los regímenes alimenticios indicados durante otras 24 semanas más (Figura 3.1).

Ambos aceites de oliva virgen extra procedían de la misma variedad de aceitunas, recogidas en la misma cosecha. Los dos aceites se elaboraron por la misma empresa y en el mismo molino, solo varió la forma de obtención del aceite. Todos los animales recibieron alimentación y agua ad libitum. El animalario del CABIMER es un animalario libre de gérmenes patógenos con temperatura, aireación, ruido y ciclos de luz/oscuridad controlados de acuerdo a los parámetros estándar.

La ingesta alimenticia se midió, así como la diferencia entre la cantidad proporcionada y la cantidad recogida.

Todos los cuidados y procedimientos de experimentación realizados con los animales se hicieron siguiendo las indicaciones para el cuidado y empleo de animales de laboratorio del CABIMER. Además, los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal y el Órgano Habilitado del CABIMER.

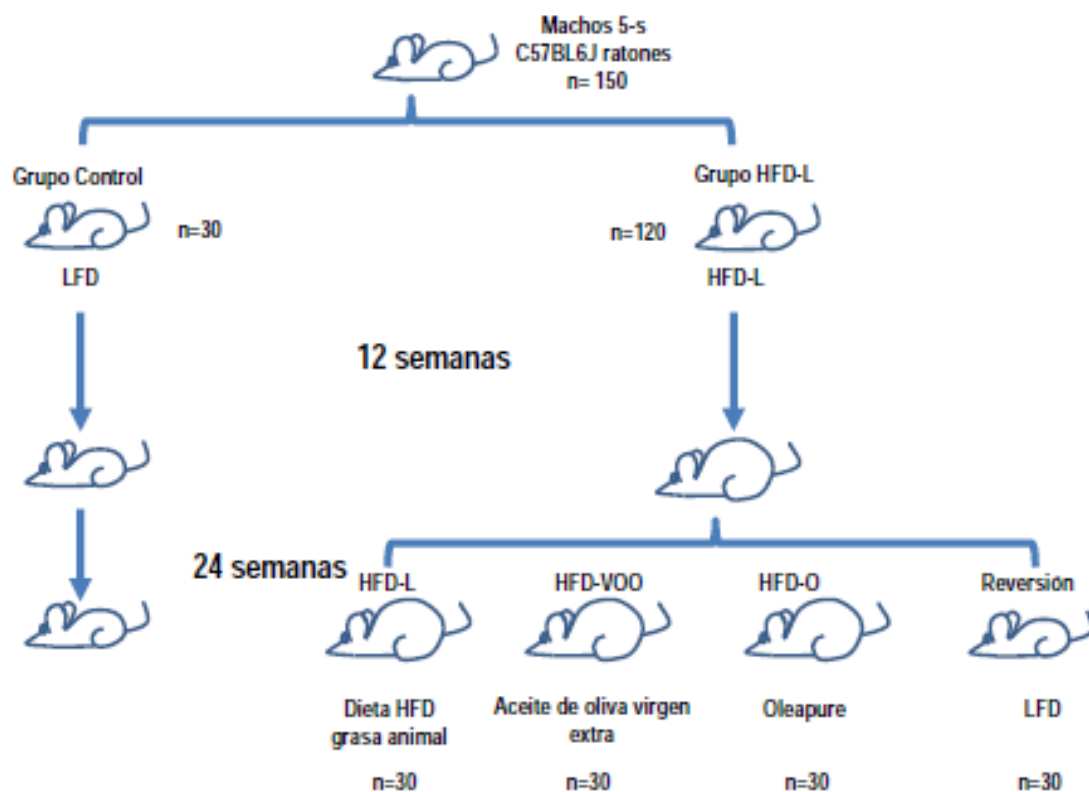


Figura 3.1. Diseño experimental de los grupos de ratones sometidos a las diferentes dietas.

3.1.2 Composición de las dietas hipercalóricas e hiperlipídicas.

Para la elaboración de las dietas se emplearon tres fuentes de grasas diferentes, sumadas a las propias de la dieta: grasa de cerdo, aceite de oliva virgen extra y aceite de oliva virgen extra Oleaster.

Como se muestra en la tabla se prepararon un total de cuatro dietas.

La dieta estándar fue proporcionada por Harlan (Teklan Global Diet 2014, Madrid, España). La grasa de cerdo utilizada fue de la marca Campofrio (San Sebastián de los Reyes, Madrid, España). Tanto el aceite de oliva virgen extra, como el aceite Oleaster fueron proporcionados por Oleapure, S.L (Sevilla, España).

La composición general de las dietas utilizadas fue analizada por nosotros en el Instituto de la Grasa, (las técnicas utilizadas vienen descrita en el apartado 3.4). A continuación, se refleja la composición de las dietas administradas a los animales de experimentación.

Tabla 1. Dietas suministradas a los animales empleando distintas fuentes de grasa.

Contenida grasa	Tipo de grasa (% kcal)	
Bajo contenido en grasa (dieta estándar)	13% Aceite de soja	C
Alto contenido en grasa	7% Aceite de soja + 42% manteca de cerdo	HFD-L
	7% Aceite de soja + 42% Aceite de oliva virgen extra EVOO	HFD-EVOO
	7% Aceite de soja + 42%, Aceite Oleaster	HFD-O

Tabla 2. Composición en ácidos grasos (%) de la grasa y aceites empleados.

	BASE	GRASA DE CERDO	OLIVA VIRGEN	OLEASTER
14:0	-	1,13	-	-
16:0	14,71	24,67	6,21	9,03
16:1 n-9	-	1,23	0,18	0,12
16:1 n-7	-	-	0,24	0,63
16:1 n-5	-	-	0,16	0,12
18:0	2,94	14,48	3,27	2,96
18:1-n9	20,59	44,88	79,58	77,66
18:1n-7	-	2,74	-	-
18:2 n6	58,82	8,91	8,91	8,08
20:0	-	0,15	-	-
18:3 n-6	-	-	0,39	0,39
18:3 n-3	2,94	0,61	0,95	0,91
20:1 n-9	-	0,99	-	-
20:2 n-6	-	0,23	0,10	0,11
22:0	-	0,05	-	-
SFA	17,65	40,48	9,49	11,99
MFA	20,59	49,84	80,16	78,52
PFA	61,76	9,75	10,35	9,49

Se entiende por base la dieta estándar sin ninguna grasa o aceite añadido. El símbolo (-) indica no analizado. SFA: ácidos grasos saturados; MFA: ácidos grasos monoinsaturados y PFA: ácidos grasos polinsaturados.

Tabla 3. Composición del insaponificable de la grasa y aceites empleados.

	GRASA DE CERDO	OLIVA VIRGEN	OLEASTER
Colesterol (%)	100,00	0,07	0,15
Campesterol (%)	-	2,81	2,86
Stigmasterol (%)	-	0,57	0,63
Clerosterol (%)	-	0,94	0,90
β -Sitosterol (%)	-	83,19	84,29
Sitosterol (%)	-	0,42	0,68
$\Delta 5$ - Avenasterol (%)	-	10,71	9,43
$\Delta 5,24$ - Stigmadienol (%)	-	0,65	0,46
$\Delta 7$ - Stigmastanol (%)	-	0,27	0,23
$\Delta 7$ - avenasterol (%)	-	0,37	0,39
Total (%)	0,53	1,47	2,34
mg/kg muestra	532	1479	2365

El símbolo (-) indica no detectado.

Tabla 4. Composición en triglicéridos (%) de la grasa y aceites empleados.

	GRASA DE CERDO	OLIVA VIRGEN	OLEASTER
PPP	0,97	-	-
MOP	1,11	-	-
MLP	0,49	-	-
PPE	1,9	-	-
POP	7,77	1,13	2,36
PLP	3,51	0,33	0,80
PEE	2,59	-	-
POE	18,04	0,73	0,99
POO	24,07	15,47	21,04
PLE	7,81	0,75	1,44
POL	10	3,73	5,15
PLL	1,9	0,73	0,84
EEE	-	0,46	0,36
EOE	1,49	0,16	0,25
EOO	4,4	6,53	5,55
ELE	0,77	0,26	0,29
OOA	-	0,56	0,33
OOO	5,36	50,71	43,97
EOL	3,39	3,72	4,66
OOL	2,73	12,96	10,45
ELL	0,85	-	-
OLL	0,85	1,80	1,52

El símbolo (-) indica no detectado.

Tabla 5. Composición en fenoles y flavonas (ppm) de los aceites empleados.

FENOLES	OLIVA VIRGEN	OLEASTER
Hty	6,87	219,28
Ty	4,52	70,83
Ac. Vanílico	1,50	1,19
Vanillina	-	0,31
Acetato HTy	2,47	3,24
1ºDervHty	-	25,68
Acetato Ty	13,81	12,88
1ºDervTy	13,51	35,01
Pinoresinol	7,47	3,97
Acetoxypinoresinol	5,61	8,27
2ºDerv Hty	3,75	39,55
2ºDerv Ty	11,32	16,95
FLAVONAS	OLIVA VIRGEN	OLEASTER
Ac. Ferúlico	8,41	7,17
PPM TY	104	477

El símbolo (-) indica no detectado Hty: hidroxitirosol; Ty: tirosol.

En definitiva los animales siguieron unas dietas que tenían la siguiente distribución: i) grupo control: 67% carbohidratos, 20% proteínas, 13% grasas (de las cuales 0,6% saturadas, 0,7% monoinsaturadas y 2,1% polinsaturadas); ii) grupo HFD-L: 39% carbohidratos, 12% proteínas, 49% grasas (de las cuales 7,5% saturadas, 9,2% monoinsaturadas y 1,8% polinsaturadas); grupo HFD-EVOO: 39% carbohidratos, 12% proteínas, 49% grasas (de las cuales 2,2% saturadas, 15,4% monoinsaturadas y 3,6% polinsaturadas) y HFD-O: 39% carbohidratos, 12% proteínas, 49% grasas (de las cuales 2,2% saturadas, 15,4% monoinsaturadas y 3,6% polinsaturadas).

3.1.3 Obtención de muestras animales.

El sacrificio de los animales se realizó mediante dislocación cervical. Tras el sacrificio y con el objetivo de la extracción de los órganos necesarios para el estudio se les practicó una incisión a lo largo de la línea alba.

Los órganos extraídos (corazón, hígado páncreas y grasas) se dividieron en dos mitades. La primera se introdujo en un eppendorf y se sumergieron en nitrógeno líquido durante unos minutos para asegurar una congelación rápida y completa. A continuación, se guardaron a -80°C. La segunda mitad se fijó en paraformaldehído al 4% para los estudios histológicos.

3.1.4 Obtención de sangre de la cola.

La obtención de sangre se realizó del extremo distal de la cola. Se cortó 2 o 3 mm y se aplicó un suave masaje en la base de la cola. Posteriormente, se colocó un capilar heparinizado sobre la misma para obtener un flujo homogéneo de la sangre hacia el capilar.

Para cortar la hemorragia usamos polvos antisépticos y antihemorrágicos (kwick-stop, ARC laboratorios, Guadalajara, España).

En cada extracción se obtenían cuatro capilares de 32 µL cada uno.

3.1.5 Extracción de tejidos.

3.1.5.1 Extracción cardiaca.

Accedimos quirúrgicamente al corazón cortando el diafragma y la parrilla costal. Acto seguido se practicó la punción cardiaca, con la que se obtuvieron aproximadamente 500 µL de sangre por animal. Una vez se obtuvo la sangre, se seccionaron todos los vasos con precaución de no cortar las aurículas y se procedió a su extracción.

3.1.5.2 Extracción hepática.

El hígado, se localizó en el hipocondrio derecho en contacto con la cara interna del diafragma. Tras cortar los ligamentos que lo unen al diafragma, se separó el hígado de estómago e intestino y se seccionó el hilio hepático. Una vez extraído el hígado, se limpió de los restos de tejido conectivo que pudiera tener adheridos a su superficie. Una vez limpio, se pesó el órgano completo.

3.1.5.3 Extracción pancreática.

Este órgano en roedores no tiene una localización concreta, sino que se encuentra de forma difusa en el interior de la cavidad abdominal, detrás del estómago entre el duodeno, ciego y bazo. Durante la disección, la distinción del tejido pancreático de la grasa se realizó teniendo en cuenta la consistencia glandular del páncreas y su tonalidad rosácea.

3.1.5.4 Extracción del tejido adiposo epididimal.

La grasa blanca epididimal, se obtuvo mediante una disección del tejido adiposo que circunda el epidídimo. Una vez extraído el tejido adiposo, se limpió de nódulos linfáticos y vesículas visibles. La totalidad del tejido epididimal se pesó.

3.1.5.5 Extracción del tejido adiposo subcutáneo.

La grasa blanca subcutánea extraída, localizada entre la dermis y las fascias subyacentes, se obtuvo del área abdominal del animal. Esta grasa se extrajo de la misma región en todos los animales.

3.1.5.6 Extracción del tejido adiposo marrón.

Con el ratón en decúbito prono, se realizó una incisión desde el occipital hasta la mitad de la caja torácica siguiendo la columna vertebral. El tejido adiposo marrón se localiza debajo de la piel y una capa de grasa blanca en la depresión romboidal, formada por la musculatura y ambas escápulas. Se separó por disección roma y se limpió de posibles restos de grasa blanca que pudiera tener.

3.2 Páncreas y homeostasis de la glucosa.

3.2.1 Determinación de la homeostasis de la glucosa y la secreción de insulina.

La determinación de glucemia en sangre, de la cola, se llevó a cabo con un glucómetro portátil (Accu-Check compact plus D-68298, Barcelona, España). La glucemia se midió entre las 08:00-10:00h tras el ayuno de toda la noche.

3.2.2 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (IPGTT).

Este test, permitió valorar el nivel de tolerancia a la glucosa mediante la administración intraperitoneal de una sobrecarga de glucosa.

Protocolo.

Los ratones permanecieron 10 horas de ayuno antes de la prueba. Tras la administración intraperitoneal de glucosa (2 g/kg de peso corporal), se determinó la glucemia en los tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos (min), con el glucómetro portátil. La solución de glucosa que se inyectó, se preparó en suero salino fisiológico estéril y se inyectaron 200 µL en cada animal. Con estos valores, se

obtuvo la curva de respuesta a la sobrecarga intraperitoneal de glucosa. El área bajo la curva se calculó por integración trapezoidal de la glucemia en todos sus puntos (Tai, 1994).

3.2.3 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa midiendo insulina en plasma.

Este test, permitió valorar la dinámica de la insulina ante una sobrecarga intraperitoneal de glucosa.

Protocolo.

Este test, se realizó igual que el test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa, solo que en vez de sacar una gota de sangre (20 μ L), se sacaron 4 gotas de sangre (100 μ L). Posteriormente, los 100 μ L de sangre se centrifugaron a 1.500 g, durante 15 min, a 4°C (centrífuga 5415R, Eppendorf, Madrid, España) y se obtuvo el plasma (unos 50 μ L). El plasma se congeló a -80°C hasta la posterior determinación de las concentraciones de insulina, mediante la técnica de Enzima inmuno ensayo (ELISA) (Roche Farma, Madrid, España). Con los valores de insulinemia obtenidos, se construyó una curva y se calculó el área bajo la curva por integración trapezoidal de la insulina en todos sus puntos.

3.2.4 Test de tolerancia intraperitoneal a la insulina (IPITT).

Este test, permitió valorar la sensibilidad a la insulina, mediante la determinación de los niveles glucémicos tras la administración de una dosis de insulina.

Protocolo.

Los ratones se sometieron a 4 horas de ayuno antes del test. Acto seguido, se administró por vía intraperitoneal 0,5 UI/kg de peso corporal, de insulina Humalin® (Eli Lilly, Madrid, España) a cada ratón y se determinó la glucemia en los minutos 0, 15, 30, 60 y 120 posteriores a la inyección. La solución de insulina que se inyectó, se obtuvo diluyendo el stock de 100 UI/ml a una dilución 1/200 en suero salino fisiológico estéril. Con los valores obtenidos, se obtuvo la curva de respuesta a la sobrecarga de insulina. De la misma manera que, en los dos test anteriores se calculó el área bajo la curva por integración trapezoidal en

todos sus puntos.

3.2.5 Obtención de islotes de Langerhans por el método de la colagenasa.

Los ratones se sacrificaron mediante fractura cervical. A continuación, se abatió la pared abdominal gracias a dos secciones horizontales inmediatamente por debajo de los rebordes costales inferiores. Se retiró el hígado y se fijó a la pared costal mediante una gasa, de tal forma que quedó expuesta la vesícula biliar y la porción proximal del conducto biliar común. Conforme se iba considerando necesario, se humedecía la cavidad con solución salina.

A partir de este momento, se trabaja en lupa estereoscópica (Nikon SMZ645, Kingston, Inglaterra) con fuente de iluminación externa (Intralux 4100, Volpi, Nueva York, USA). Se ligó la desembocadura del conducto pancreático principal a nivel de la ampolla de Water, para evitar la salida de la solución colagenasa al duodeno. Posteriormente, se realizó una pequeña incisión en la porción proximal del conducto biliar común, a unos dos o tres milímetros por debajo de la vesícula biliar. Por esta incisión se introdujo una aguja de insulina (BD Microlance 3 30G 1/2, 0.3x13, Madrid, España) previamente doblada en ángulo recto y con su punta suavizada, y se pasó una ligadura que fijó la aguja a su posición.

Con una jeringa, se inyectaron 8 mL de la solución de aislamiento Krebs Ringer bicarbonato (115 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 1,2 mM NaH₂PO₄, 1,1 mM MgCl₂, 25 mM Hepes, 2,56 CaCl₂, 5,6 mM glucosa y 1% albúmina sérica Bovina (BSA) fracción V (Roche Diagnostic, Barcelona, España), ajustada a pH=7,4 con NaOH 1M) a 4°C, suplementada con 8 mg de colagenasa tipo V (C9263; Sigma, Madrid, España) con una actividad de digestión de 448 unidades/mg. De este modo, se logró un buen acceso de la colagenasa a todo el páncreas y se facilitó su extracción.

Una vez se extrajo el páncreas de la cavidad abdominal por disección, se transfirió a un tubo de 15 mL y se sumergió en un baño termostatzado (Julabo TW12, Seelbach, Alemania) a 37°C durante 10 min, agitándose ocasionalmente. Transcurrido ese tiempo, se paró la digestión mediante la adición de solución de aislamiento a 4°C. El digerido se agitó suavemente con una pipeta para disgregar y resuspender el tejido, se dejó sedimentar descartando el sobrenadante. Posteriormente, se volvió a añadir solución de aislamiento y se repitió dos veces

más este ciclo de lavados.

Finalmente, el digerido se resuspende en 10 mL solución de aislamiento y se colocan alícuotas de 2 ó 3 mL del digerido, en una placa Petri de 90 mm de diámetro, de vidrio y de fondo negro, que contiene solución de aislamiento. Los islotes se recuperan uno a uno con pipeta automática de 100 μ L (Gilson, Middleton, USA) para separarlos de los restos de tejido exocrino, bajo la lupa estereoscópica ya indicada.

3.2.6 Incubaciones estáticas.

Para medir la insulina secretada por los islotes de Langerhans, los islotes se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos (NuncTM Multidish, Thermo Scientific, Barcelona, España). Se sembraron 5 islotes por pocillo, procurando repartirlos de forma homogénea en tamaño, en 250 μ L de solución de perfusión (120 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,56 mM CaCl₂, 1% BSA y 2,75 mM glucosa, pH=7,4). Después los islotes se incubaron durante 60 min, a 37°C, 95% O₂ y 5% CO₂ en un incubador (Thermo Electron Corporation, Breda, Holanda). Posteriormente, se eliminó la solución de perfusión y los islotes se volvieron a incubar durante 60 min, en las mismas condiciones y usando la misma solución de perfusión, pero con diferentes concentraciones de glucosa (2,5 mM; 5,5 mM; 11,1 mM; 16,75 mM y 22,2 mM). Se pusieron tres pocillos por cada concentración de glucosa.

Una vez finalizada la incubación, se recogieron 200 μ L del medio de perfusión, de cada uno de los pocillos y se guardaron en eppendorf (Eppendorf, Madrid, España) a -80°C para la posterior determinación de insulina por ELISA. Tras recoger el medio de incubación, se comprobó en los pocillos que los islotes seguían en ellos.

3.2.7 Contenido de insulina.

Tras terminar los experimentos de secreciones estáticas, se recogieron los islotes y se centrifugaron a 500 g. durante 5 min. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μ L de tampón de lisis (0,18 M de ácido clorhídrico y 75 % de etanol en agua destilada) por islote y se pipeteó para ayudar

a romper las células. Posteriormente, se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, el lisado se pasó a tubos eppendorf estériles y se centrifugaron a 1.000 g. 5 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante, se pasó a eppendorf estériles y se guardaron las muestras a -20 °C hasta su cuantificación mediante ELISA.

3.3 Determinación del perfil lipídico plasmático.

3.3.1 Medida de colesterol total.

Las medidas de colesterol se realizaron mediante Reflotron Cholesterol Test (Roche Diagnostic, Barcelona, España).

Este método consistió en aplicar 32 µl de sangre sobre las tiras reactivas. Las cuales, eliminaron los eritrocitos dejando pasar el plasma a la zona reactiva. Las muestras, se dejaron incubar en el reflowtron durante 150 seg a 37°C. Allí los esteres de colesterol, por acción de la colesterol esterasa, se separaron en colesterol y su ácido graso correspondiente.

Una vez separado el colesterol, y con ayuda de la colesterol-oxidasa, se obtuvo colesteno y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, por acción de la peroxidasa de rábano (POD), rompió el peróxido y liberó el oxígeno que a su vez oxidó la 3,5,3',5'-tetrametilbenzamidina (incoloro), convirtiéndola en 3,5,3',5'-tetrametilbenzimidina diimina (azul). El reflowtron, midió el colorante generado a 642 nm, dándonos un valor de la concentración de colesterol en sangre expresada en mg/dL.

3.3.2 Determinación del colesterol HDL.

Principios del análisis.

Para la determinación del HDL-colesterol en plasma, se utilizó una mezcla de ácido fosfotungstico y $MgCl_2$ (Phosphotungstate precipitant, Roche Diagnostic, Barcelona, España). Este reactivo, se unió a las LDL y VLDL precipitándolas. Se recogió la fracción sobrenadante en la que solo quedaron las HDL.

Una vez se obtuvo la fracción con las HDL, los esteres de colesterol por acción de la colesterol esterasa se separaron en colesterol y sus ácidos grasos correspondientes.

Una vez separado el colesterol, y con ayuda de la colesterol-oxidasa, se obtuvo colesteno y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, por acción de la peroxidasa de rábano (POD), rompió el peróxido y liberó el oxígeno que oxidó la 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red reagent) produciendo resorufina de alta fluorescencia. De esta forma, la medida de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de colesterol HDL en la muestra.

Protocolo.

Se pipetearon 10 μ L de plasma, se añadieron a 10 μ L de PBS y se agitó. Después, se le añadió a la mezcla de plasma y PBS 50 μ L del reactivo precipitante. A continuación, se agitó y se dejó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó 7 min a 19.969 g (Max-XP Ultracentrifuge; rotor JA-18.1, Beckman-Coulter, Indianapolis, IN, USA).

Finalmente, se tomaron 10 μ L de sobrenadante (HDL-c) y se continuó con el protocolo descrito en el kit (Amplex Red cholesterol assay kit, Invitrogen, Barcelona, España). La densidad óptica de cada pocillo se midió en el lector de placas Varioskan (Termo Electrón Corporation, Pittsburgh, PA, USA).

3.3.3 Determinación de triglicéridos.

Principios del análisis.

La determinación de triglicéridos, fue realizada mediante el “triglycerides liquid stable reagent” (Infinity Thermo Scientific, Madrid, España).

Con este método, los triglicéridos del plasma, se hidrolizaron mediante una lipasa disociándolos en ácidos grasos libres y glicerol. El glicerol, a su vez fue fosforilado por acción de la glicerol quinasa rompiendo el adenosin trifosfato (ATP). El glicerol 3 fosfato, por acción de la glicerolfosfato oxidasa, produjo peróxido de hidrógeno al oxidar la dihidroxiacetona fosfato. El peróxido, por acción de la peroxidasa, reaccionó con la 4-aminoantipirina (4-AAP) y la 3,5-dicloro-2-sulfonato de hidroxibenceno, esta reacción produjo un colorante rojo.

Protocolo.

Se tomaron 2 μ L de plasma, y se continuó con el protocolo descrito en el kit. La densidad óptica de cada pocillo se midió en el lector de placas Varioskan.

3.4 Lipidómica hepática.

3.4.1 Extracción de los lípidos totales en hígado.

Los hígados, se fueron descongelando y se limpiaron con PBS para evitar contaminaciones de otros tejidos o restos de sangre.

Una vez preparadas las muestras, se utilizó para la extracción de lípidos totales una modificación del método de Folch (Folch, Lees, Sloane-Stanley, & others, 1957)

Se partió de una muestra de 0,5 g de hígado la cual, se homogeneizó utilizando un politrón. Una vez homogeneizado el tejido en 50 mL de mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v), se dejó toda la noche a 4°C para permitir una mayor penetración del disolvente.

La mezcla de cloroformo:metanol, que contenía los lípidos totales extraídos, se rompió con KCl 0,1M, se filtró para retirar los restos de tejido y tras una agitación vigorosa de 1 min, se separaron las dos fases por gradiente de densidad. La fase metanólica que lleva los componentes acuosos (superior), y la fase clorofórmica que contiene el extracto lipídico (inferior). Se recogió la fase clorofórmica y se filtró sobre papel de filtro Whatman, el cual contenía Na₂SO₄ anhidro, para retirar los restos acuosos que pudieran arrastrarse.

La fase acuosa se lavó tres veces más, dos con la misma cantidad de cloroformo: metanol (2:1, v/v) y una última con la misma cantidad de cloroformo. Acto seguido se repitió el proceso, agregándolo al ya obtenido con anterioridad.

La totalidad de la fase clorofórmica extraída, se llevó a sequedad con ayuda de un rotavapor (CH-9230 BUCHI, Flawil, Suiza) mantenido a 28°C a una velocidad de 50 g. Una vez secos, se añadió 1 mL de cloroformo para resuspender la fase lipídica. Este mililitro, se llevó a viales de cristal con tapón de teflón, y bajo atmósfera de nitrógeno se guardaron a 4°C.

3.4.2 Separación de fracciones lipídicas por extracción en fase sólida (SPE).

Principios.

La SPE, es una técnica de preparación de muestra que limpia y/o concentra muestras antes del análisis, y puede ser empleada para que la muestra pase a

través de un lecho de fase sólida que retiene diferentes tipos de analitos. Los analitos irán eluyendo, al tener mayor afinidad por el disolvente que por la columna. La elución puede realizarse con un volumen mayor de disolvente para, con posterioridad, concentrar la muestra aumentando los límites de detección y simplificando el análisis.

Protocolo.

Se dispusieron una bomba de vacío, un desecador y seis columnas de LC-Diol (Sigma-Aldrich, Madrid, España) conectadas a un soporte.

Se administró vacío a las columnas y se añadieron 2 volúmenes de 2 mL, evitando que después del segundo volumen se secase la columna.

Se añadieron 200 µL de muestra en las columnas y se abrió el vacío, para que entrara la muestra.

Se añadieron 2 volúmenes de 2 mL de hexano: cloruro de metileno (9:1, v/v), evitando que después del segundo volumen se secase la columna.

Esta fracción contenía tantos los esteres de colesterol como los triglicéridos.

Para retirar la fracción de fosfolípidos, se añadieron primero 2 mL de metanol y se recogieron, a continuación, se añadió acetona que se recogió en el mismo tubo.

Las fracciones lipídicas que se extrajeron, se pusieron a secar con nitrógeno y se resuspendieron en 1 mL de hexano.

3.4.3 Metilación de ácidos grasos.

100 µL de los lípidos totales y de la fracción de fosfolípidos extraídos de cada muestra, se vertieron en un tubo de 25 mL, donde se llevó a sequedad. En los mismos, se vertió metilato sódico a una concentración de 0,5% en metanol anhidro (m/v). Estas se incubaron 30 min a una temperatura de 80°C con plato poroso.

Tras la incubación, se añadió fenolftaleína como indicador del pH y se neutralizó la solución con 5 mL de H₂SO₄ al 6% (v/v) en metanol anhidro.

Se pusieron las muestras de nuevo a reflujo durante 20 min más. Tras atemperar los tubos, se añadieron 5 mL de una dilución saturada de NaCl y se agitó durante 1 min vigorosamente. Para la extracción de los ácidos grasos metilados se

añadieron 3 lavados de hexano, recogiendo la fase superior (orgánica) y se evaporaron a sequedad en corriente de nitrógeno.

Las muestras se redisolviéron en 200 µL de hexano, para su posterior análisis por cromatografía gaseosa.

3.4.4 Análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

Para el análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos, se utilizó un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 Series II (Hewlett-Packard, Avondale, USA), equipado con un detector de ionización de llama, dotado de una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y espesor de película de 0,25 µm).

De la muestra a analizar, disuelta en hexano, se inyectaron 2 µL.

Como gas portador se empleó nitrógeno a una velocidad de 25 mL/min y como comburente aire sintético e hidrógeno (2mL/min y 250 KPa en la cabeza de la columna).

La temperatura del detector y del inyector fue de 250°C, mientras que el análisis de desarrollo partió de una temperatura inicial de 130°C y llegó hasta 200°C en el horno, con una velocidad de 2°C/min. Los ácidos grasos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los de patrones inyectados en las mismas condiciones.

Para identificar aquellos ácidos grasos para los cuales no se disponía de patrones, se utilizó un espectrómetro de masas (AEI MS 30 VG70, VG analytical, Manchester, UK). Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: ionización de impacto de electrones 70 eV, voltaje de aceleración 4.0 KV, corriente de emisión 100 µA y temperatura de la fuente de iones 200°C.

Las áreas de los picos fueron calculadas por el sistema integrador Hewlett Packard 3990 (Hewlett-Packard, Avondale, USA).

3.5 Determinación del estado inflamatorio y parámetros hormonales.

3.5.1 Extracción de citoquinas del tejido adiposo.

Las muestras de tejido adiposo, se depositaron en tubos de Lysing Matrix D (MP

Biomedicals, Madrid, España), 250 mg de tejido adiposo por mililitro de buffer fosfato salino suplementado con inhibidores de proteasa (Complete Mini, Roche Diagnostics, Barcelona, España).

Para homogeneizarlo, se sometieron a rotura física en un FastPrep-24TM-5G con un programa de 1 minuto a 1500 RPM (MP Biomedicals, Madrid, España). Posteriormente, el homogenado se centrifugó (Max-XP Ultracentrifuge; rotor JA-18.1) a 5000 g, 4°C, durante 5 min. El sobrenadante, se transfirió a tubos nuevos, donde se volvió a centrifugar (Max-XP Ultracentrifuge; rotor JA-18.1) a 10000 g, 4°C, durante 10 min. El sobrenadante final se guardó a -80°C hasta su posterior análisis.

3.5.2 Test ELISA para parámetros inflamatorios y hormonales.

3.5.2.1 Protocolo del análisis de la citoquina TNF- α en tejido adiposo.

En este ensayo se utilizaron dos anticuerpos monoclonales, dirigidos contra diferentes antígenos de la citoquina TNF- α . El primero, pegado a la placa, capturó las moléculas de TNF- α . El segundo anticuerpo, conjugado con la peroxidasa (POD), se unió a las moléculas de TNF- α capturadas. Una vez unida rompió el peróxido de hidrógeno dando especies moleculares de oxígeno, que oxidaron el sustrato 3,5,3',5' - tetrametilbenzamidina convirtiéndolo en 3,5,3',5' - tetrametilbenzamidina diimina (azul). La reacción se paró con ácido sulfúrico. Esta acidificación provocó un cambio del 3,5,3',5' - tetrametilbenzamidina diimina a amarillo.

Se tomaron las muestras por duplicado y se continuó con el protocolo descrito en el Mouse TNF ELISA Kit BD Biosciences (San Diego, CA, USA). La densidad óptica de cada pocillo se midió en el lector de placas Varioskan a 450 - 570 nm.

3.5.2.2 Protocolo del análisis de la citoquina IFN- γ en tejido adiposo.

Se empleó el kit Mouse IFN- γ ELISA Kit BD Biosciences (San Diego, CA, USA) y el procedimiento del ensayo y el protocolo es igual que en el caso anterior, solo que los anticuerpos monoclonales usados fueron frente antígenos de la citoquina IFN- γ .

3.5.2.3 Protocolo del análisis de la citoquina IL-6 en tejido adiposo.

Se empleó el kit Mouse IL-6 ELISA Kit BD Biosciences (San Diego, CA, USA) y el procedimiento del ensayo y el protocolo es igual que en el caso anterior, solo que los anticuerpos monoclonales usados fueron frente antígenos de la citoquina IL-6.

3.5.2.4 Protocolo del análisis de la insulina en plasma.

Se empleó el kit Mouse insulin ELISA Kit Mercodia AB (Uppsala, Suecia) y el procedimiento del ensayo y el protocolo es igual que en el caso anterior, solo que los anticuerpos monoclonales usados fueron frente antígenos de la insulina.

3.5.2.5 Protocolo del análisis de leptina en plasma.

Se empleó el kit Mouse leptin ELISA Kit R & D Systems Inc (Minneapolis, MN, USA) y el procedimiento del ensayo y el protocolo es igual que en el caso anterior, solo que los anticuerpos monoclonales usados fueron frente antígenos de la leptina.

3.5.3 Inmunoensayo de marcadores inflamatorios por multiplex.

Principio del análisis.

Los inmunoensayos de Multiplex de Luminex (Millipore, Corporation, Billerica, MA, USA), se basan en la tecnología X-Map, la cual utiliza microesferas de poliestireno que contienen distintas proporciones de dos fluorocromos en su interior, que al ser excitadas por el láser del citómetro de flujo emiten señales diferentes, siendo así posible separar las distintas poblaciones de microesferas por la composición de fluorocromos. Usando unas proporciones precisas de ambos fluorocromos, podemos llegar a distinguir hasta 100 grupos de microesferas distintas. Cada grupo de microesferas tiene en su superficie un anticuerpo específico, al que se unirá el analito en estudio. La adición de un anticuerpo secundario biotinilado frente al analito y la adición posterior de

estreptavidina conjugada con ficoeritrina, provocan la emisión de fluorescencia tras la excitación. La cuantificación de las moléculas que emiten fluorescencia, se realiza mediante el uso de un citómetro de 2 láseres (Bio-plex 200, Bio-Rad Laboratories, Madrid, España). Uno de los láseres discrimina entre los distintos tipos de poblaciones de microesferas, y el segundo láser excita la ficoeritrina produciendo la fluorescencia, la cual será proporcional a la cantidad de analito unido a la microesfera.

Protocolo experimental.

Esta técnica se utilizó para medir los niveles de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ en el plasma de los ratones. Se tomaron 25 μ L por duplicado de las muestras y se continuó con el protocolo descrito en el kit.

3.6 Análisis de expresión de genes.

Se extrajo el ARN total de hígado y tejido adiposo epididimal usando RNeasy Mini Columns (Qiagen, Hilden Germany). La calidad y la cantidad de ARN se analizaron usando un Espectrofotometro Nanodrop (NanoDrop, Madrid, España). El ARN total se transcribió de forma complementaria con ADN usando el Reverse Transcription System de Qiagen (Hilden, Germany).

Las PCR cuantitativas se realizaron en tripletes para cada una de las muestras en un sistema 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los resultados están expresados de forma normalizada con respecto a los niveles de un gen housekeeping (Gapdh endógeno) los cebadores usados fueron los expresados en la tabla siguiente.

Tabla 6. Secuencia de los cebadores empleados.

Gene	Gene Bank no.	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
Mouse			
<i>Cd11b</i>	NM_001082 960	GGGTCATTCGCTACGTAAT TGG	TGTTCAACCAGCTGGCTTAG ATG
<i>Cd11c</i>	NM_021334	ACGTCAGTACAAGGAGATG TTGGA	ATCCTATTGCAGAATGCTTC TTTACC
<i>F4/80</i>	NM_010130	GATGAATTCCCGTGTTGTT GGT	ACATCAGTGTTCCAGGAGA CACA
<i>Pnpla3</i>	NM_054088	CTCGGCCGTATAATGATGG AGA	GACCTGGTGGACATTGTCT G
<i>Ppar-α</i>	NM_011144	CGTACGGCAATGGCTTTAT C	AACGGCTTCCTCAGGTTCTT
<i>Cd36</i>	NM_001159 558	TCTCCCTGAAGCCAATCT	GTTTTCTCGCCAACTCCC
<i>Gapdh</i>	NM_001289 726	TTGTGATGGGTGTGAACCA CGAGA	GAGCCCTTCCACAATGCCA AAGTT
Gene	Gene Bank no.	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')

3.7 Histología.

3.7.1 Inclusión de muestras en criostato y procesamiento.

Las muestras de tejido se fijaron directamente con PFA 4% durante 6 horas a 4°C. Tras la fijación, se lavaron con PBS (10 min, 3 veces). Al finalizar los lavados, las muestras se sumergieron en un gradiente creciente de sacarosa (20-30% sacarosa, 0,05% ácida en PBS). Una vez finalizado el paso por el gradiente se incluyeron en una solución de OCT y sacarosa al 30% (sacarosa al 30%, 0,05% ácida en PBS), a partes iguales durante 15 min.

Para finalizar se sacó la muestra de la solución y se incluyó en OCT. Se realizaron cortes de 10 µm mediante criostato motorizado Leica CM3050 S (Leica microsystemas, Barcelona, España) y las muestras obtenidas se colocaron sobre portas superfrost (tres cortes/porta con muestras separadas 40 µm).

3.7.2 Inclusión de muestras en parafina y procesamiento.

Las muestras de tejido se fijaron directamente con PFA 4% durante 6 horas a 4°C. Tras la fijación, las muestras se lavaron con PBS (10 min, 3 veces) y se mantuvieron en alcohol 70% hasta su posterior inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 5 µm mediante micrótopo motorizado cortes parafina Leica RM 2255 (Leica microsystemas, Barcelona, España), y las muestras obtenidas se colocaron sobre portas superfrost (tres cortes/porta con muestras separadas 40 µm).

Para el desparafinado de las muestras, las portas se mantuvieron 20 min a 55°C en estufa. Transcurrido este tiempo, las muestras se sumergieron en xilol durante 5 min para eliminar los restos de parafina, seguido de un segundo lavado de 5 min en xilol nuevo. A continuación, se rehidrataron en gradiente decreciente de alcohol en agua (dos veces 100°C, 95°C, 80°C y 70°C), durante 1 min en cada uno de ellos.

3.7.3 Tinción con hematoxilina-eosina (H&E).

Principios.

La tinción con H&E es la más utilizada en histopatología. La eosina, es un colorante ácido que se asocia y colorea las estructuras catiónicas, tales como los filamentos citoplasmáticos, membranas intracelulares y fibras extracelulares permitiendo distinguir los detalles del citoplasma celular (color rosado o rojo). La hematoxilina actúa como colorante básico, por lo cual se asocia y colorea estructuras aniónicas identificando las estructuras finas del núcleo (color azul o púrpura).

Protocolo.

Se sumergió en hematoxilina de Mayer (BIO-Optica, Milan, Italia) durante 4 min. Para quitar el sobrante de la coloración, se dieron 2 pases de agua corriente durante 10 min y 5 pases en alcohol-ácido (1% de ácido clorhídrico fumante en alcohol al 70%).

Para parar la reacción del alcohol ácido se le dieron 3 pases en agua. Tras el lavado del ácido, sumergimos los portas 2 min en eosina. Para lavar el sobrante de eosina, se dieron 2 pases de agua corriente, en el segundo se mantuvo hasta que dejó de salir colorante.

Por último, se deshidrató y se monta en resina acrílica con base de xileno (DPX).

3.7.4 Tinción rojo sirio.

Principio.

Es un tinte extremadamente hidrofílico, usado para detectar las fibras de colágeno tipo I-III, fibras reticulares, membranas basales y algunas mucinas.

Protocolo.

Los portas se sumergieron en hematoxilina de Weigert's (Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 15 min. Tras la tinción, se lavaron en agua durante 10 min y se sumergieron en el reactivo picro-sirius red durante una hora.

Una vez teñido, se sumergieron los portas en agua ácida dos veces y se agitó vigorosamente para quitar el exceso de picro-sirius red.

Se deshidrató en 2 pases en alcohol 100%, se limpió en xileno y se montó en DPX.

3.7.5 Cuantificación muerte adipocitaria.

El objetivo de esta técnica, fue determinar el porcentaje de adipocitos muertos. Para ello, se utilizó la técnica descrita en el apartado 1.6.3 y se realizaron fotografías a 10X en cada corte analizado.

La cuantificación se realizó de forma manual sobre diferentes zonas del tejido. Los resultados se mostraron como porcentaje de adipocitos muertos con respecto al total.

3.7.6 Cuantificación de apoptosis en cortes histológicos de páncreas.

El objetivo de esta técnica fue determinar el porcentaje de células beta apoptóticas. Para ello, se utilizó la técnica descrita en el apartado 1.5.10 y se realizaron fotografías a 40X de todos los islotes presentes en cada corte analizado.

Las cuantificaciones se realizaron mediante el programa Metamorph 4.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Los resultados se mostraron como porcentaje de células positivas para TUNEL, respecto al total de células positivas para insulina.

3.7.7 Cuantificación del tamaño de los adipocitos.

El objetivo de esta técnica, fue determinar el tamaño de los adipocitos. Para ello se realizó una tinción H&E, ya descrita en el apartado 1.6.3. Se obtuvieron fotografías con el objetivo 10X de forma aleatoria, cuantificando el número de adipocitos y la superficie que ocupaban mediante el programa ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012).

3.7.8 Tinción rojo oleoso.

Principio.

El mecanismo histológico de la tinción de los lípidos es un proceso físico, por el cual, el tinte es más soluble en la fracción lipídica del tejido que en el disolvente vehicular. Por esta razón las grasas neutras se tiñen de un color rojo-naranja.

Protocolo.

Se colocaron los portas en la solución PBS durante 15 min. Para quitar el exceso de tinción, se lavaron en agua destilada. Una vez lavados se contratiñeron con hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, Madrid, España) acetificada durante 30 segundos y se volvió a lavar en agua durante 10 min. Las muestras se montaron en gelatina-glicerina.

3.7.9 Semicuantificación de esteatosis en el hígado.

El objetivo de esta técnica fue determinar el nivel de esteatosis. Para ello, se utilizó la técnica descrita en el apartado 1.6.5 y se realizaron fotografías a 10X de diferentes zonas del tejido de un modo aleatorizado.

Para la cuantificación, se utilizó el programa ImageJ, con el que se observó el porcentaje de área marcada con Sirius Red con respecto al total.

3.8 Inmunohistoquímica.

3.8.1 Inmunohistoquímica F4/80.

Los portas, se lavaron durante 5 min en PBS y se procedió a eliminar la actividad peroxidasa endógena mediante incubación de los mismos durante 10 min en peróxido de hidrógeno al 5%. Se volvió a lavar durante 5 min en PBS, y se bloquearon las uniones inespecíficas con BSA al 3% en PBS durante una hora a temperatura ambiente.

El anticuerpo primario (IgG₁; monoclonal Santacruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) se diluyó a la concentración de 1:100 en BSA al 3% en PBS.

Las muestras, fueron incubadas en presencia del anticuerpo primario de estudio toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

A continuación, se procedió a eliminar el exceso de anticuerpo sometiendo las muestras a 3 lavados consecutivos con PBS durante 5 min.

Posteriormente, se utilizó un anticuerpo secundario IgG específico monoclonal biotinilado (BD Biotechnology, Madrid, España), para la detección de la parte constante de anticuerpo primario. Para el anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:2000, incubándose 2 horas a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se realizaron 3 lavados con PBS (5 min por lavado).

Para la reacción de inmunoperoxidasa, se utilizó el kit ABC reagent (Vectastin Elite ABC, Vectorlabs, Peterborough, United Kingdom) preparado 35 min antes de su uso y se dejó incubar con las muestras durante media hora.

Acto seguido, se lavó con PBS 3 veces durante 5 min y se añadió el sustrato 3,3'-Diaminobenceno (DAB) para peroxidasa revelando la tinción.

Para finalizar, se contratiñó con hematoxilina de Hiss (Sigma-Aldrich, Madrid, España) se deshidrato y se montó con DPX.

3.8.2 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

Principios del análisis.

El objetivo de esta técnica es reconocer las células que se encuentran en apoptosis. Para ello, el kit se basa en el reconocimiento de fragmentos de ADN originados durante el proceso de apoptosis. Estos fragmentos son reconocidos, gracias a la unión en sus extremos 3'OH de nucleótidos marcados con un fluorocromo mediante la acción de la encima transferasa terminal (TdT).

Protocolo.

Se realizó el desparafinado de las muestras por el método descrito en el apartado 1.6.2. Para la exposición antigénica, se introdujeron las muestras en citrato buffer pH 6.0 y se puso a 750W de irradiación durante 1 minuto. Acto seguido, se enfriaron rápidamente añadiendo 80 ml de agua doble destilada a temperatura ambiente. Para terminar de limpiar las muestras, se sumergieron en PBS. Para el bloqueo se sumergieron las muestras durante 30 min en Tris-HCl 0.1M pH 7.5, el cual contiene 3% BSA y 20% de suero bovino. Una vez bloqueadas, se les

quitó el exceso de bloqueo lavando los portas 2 veces en PBS y se añadió la mezcla del reactivo TUNEL (In situ cell death detection kit, fluorescein, Sigma-Aldrich, Madrid, España) Se dejaron durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda y en oscuridad.

Aquí terminó el protocolo para el TUNEL, pero se continuó realizando una tinción de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e insulina. El propósito fue identificar los núcleos (DAPI) y las células beta (insulina).

Después de lavar en PBS 3 veces durante 5 min, se realizó un bloqueo con BSA al 3% en PBS en cámara húmeda durante 1 hora. Se volvió a lavar 3 veces durante 5 min, y se incubó con el anticuerpo anti-insulina monoclonal a una dilución 1:400 (Sigma-Aldrich, Madrid, España). De nuevo, se lavó 3 veces durante 5 min y se incubó con el secundario (IgG cabra anti-ratón Alexa Fluor 568; 1:500 ; Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Se quitó el sobrante del anticuerpo secundario, mediante lavados 3 veces durante 5 min, acto seguido, se dejó incubar con el DAPI (1:1000) 5' en cámara húmeda. Se lavó en PBS 5 min, se pasó a agua destilada y se realizó el montaje con medio de montaje fluorescente (Dako-Agilent Technologies, Madrid, España).

3.9 Proteómica hepática.

3.9.1 Separación del extracto proteico.

Se separó un homogenado de proteínas citosólico por cada una de las muestras de hígado (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2012). Esta separación, se realizó en un gel bidimensional (2-D) de electroforesis usando BioRad (Hemel Hempstead, UK).

Para la separación en la primera dimensión, se utilizaron tiras de 17 cm con un gradiente inmóvil de pH (IPG) entre 5-8.

Para la separación de la segunda dimensión SDS-PAGE, se realizó en geles con gradiente de acrilamida (8-16%) de tamaño 18 x 18 cm.

Las muestras se corrieron de forma aleatorizada en grupos de 12, para prevenir errores de experimentación.

Los geles se escanearon con el Flamingo Fx (BioRad, Hemel Hempstead, UK), con una configuración de intensidad media y resolución de 100 µm.

3.9.2 Selección de proteínas.

Se analizó usando Samespots (Non-linear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK), con él se obtuvieron los valores de densidad de pocillos de los geles, los cuales se exportaron a Same Spots software en R 2.11.1. (R foundation for Statistical Computing, Viena, Austria), para realizar posteriores análisis estadísticos. Las manchas con una densidad que significativamente difirieron entre los tratamientos, se extrajeron de los geles SDS-PAGE usando el robot BioRad spot cutter.

3.9.3 Tripsinización y separación cromatografía.

Se tripsinizaron usando el protocolo de MassPrep Station (Micromass, Hemel Hempstead, UK), y se analizaron usando un sistema LC nano (LC Packings, Camberly, Surrey, UK), con una columna de flujo de 0,3 $\mu\text{m}/\text{min}$, un automatizador de muestras que introduce un volumen de 10 μL , y un intercambiador de columnas. Las nanocolumnas fueron C18 PepMap 100, 15 cm x 75 μm id, 3 μm , 100 A (LC Packings, Barcelona, España).

Para la curva de disolventes del HPLC, se utilizó acetonitrilo al 2% y ácido fórmico al 0,1 (A), y 80% ACN, y 0,08% ácido fórmico (B). El gradiente de inicio comenzó con un 5% en B, incrementando hasta un 50% en B durante 30 min, después va incrementando hasta un 80% durante otros 2 min. La espectrometría de masas, se realizó mediante un Q-Trap (Applied Biosystems/MDS Sciex, Warrington, Cheshire, UK) triple cuadrupolo con un spray de iones, donde el Q3 trabaja como una trampa lineal de iones. La aguja de voltaje se ajustó a 2800V. La energía de colisión fue regulada según necesidades (un máximo de 80 eV). Se utilizó un total de iones referidos a la base de datos de MASCOT (Matrix Ciencia, Londres, UK), utilizando la base de datos MSDB. Los criterios de asignación de búsqueda fueron: i) valores de cero o uno; ii) tolerancia de masa de péptido $\pm 1,5$ Da; iii) fragmento de tolerancia de masa de $\pm 1,5$ Da; iv) tripsina como enzima digestiva; v) Carbamidometil como fuente fija de cisteína y vi) la oxidación de la metionina como un marcador variable.

3.9.4 Ingenuity pathway analysis (IPA).

Para realizar un análisis de las posibles rutas metabólicas en función de la semicuantificación proteica se usó el programa Ingenuity System Pathway (Qiagen Bioinformatics, Aarhus, Dinamarca) y de esta forma determinar estadísticamente la probabilidad e identificar las posibles diferencias metabólicas entre los diversos grupos.

3.10 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Instat versión 3.0 para Windows (GraphPad Software, Lo Jolla, CA, USA). Este programa primero realizó un test de Kolmogorov-Smirnov a las muestras para comprobar la normalidad de los datos. En las muestras que seguían una distribución normal, las comparaciones entre varios grupos se realizaron mediante el test de ANOVA, mientras que para comparaciones entre 2 grupos se utilizó el estadístico t de student para muestras no pareadas. En el caso de comparaciones no paramétricas, debido a la ausencia de una distribución normal, se aplicaron el test de Kruskal-Wallis y el test de U de Mann-Whitney para comparaciones de 2 grupos.

Los datos se expresaron con media \pm error estándar de la media (ESM). Para la significación estadística se fijó en 0,05 ($P < 0,05$) como significativo (*), $P < 0,01$ como muy significativo (**), $P < 0,001$ como extremadamente significativo (\ddagger).

3.9.1 Análisis estadístico en proteómica.

Los datos, se presentan en forma de media \pm la desviación típica. El logaritmo de los datos fisiológicos transformados, se analizó por análisis de variaciones entre los grupos tratamiento. El logaritmo transformado de la densidad de las manchas, normalizado por cálculos del software SameSpots, donde es analizado por variaciones en el grupo tratamiento. Los principales componentes analíticos, se realizaron en una matriz de correlación de los datos del logaritmo transformado de la densidad de los pocillos.

Para calcular las diferencias se utilizó Test en R (R Foundation for Statistical

Computing). Los pocillos con diferencias significativas fueron seleccionados e identificados.

IV. RESULTADOS.

4.1 Desarrollo del modelo experimental y evolución de las muestras.

4.1.1 Evolución de peso corporal.

Se realizó un control del peso corporal de los animales, una vez cada dos semanas, durante las 36 semanas que duró el tratamiento. Como podemos observar en la figura 4.1, la dieta HFD-L aumentó significativamente el peso corporal a partir de la segunda semana de tratamiento dietético ($*p<0,05$). Esta diferencia fue aumentando hasta las 12 semanas de tratamiento ($^{\dagger}p<0,001$), momento en el que se modificó su composición lipídica (HFD-VOO y HFD-O), lo que produjo una reducción significativa del peso corporal de ambos grupos ($*p<0,05$) respecto al grupo HFD-L. Ambos grupos, al igual que el grupo R alcanzaron el mismo peso que los animales controles, al final de la intervención dietética.

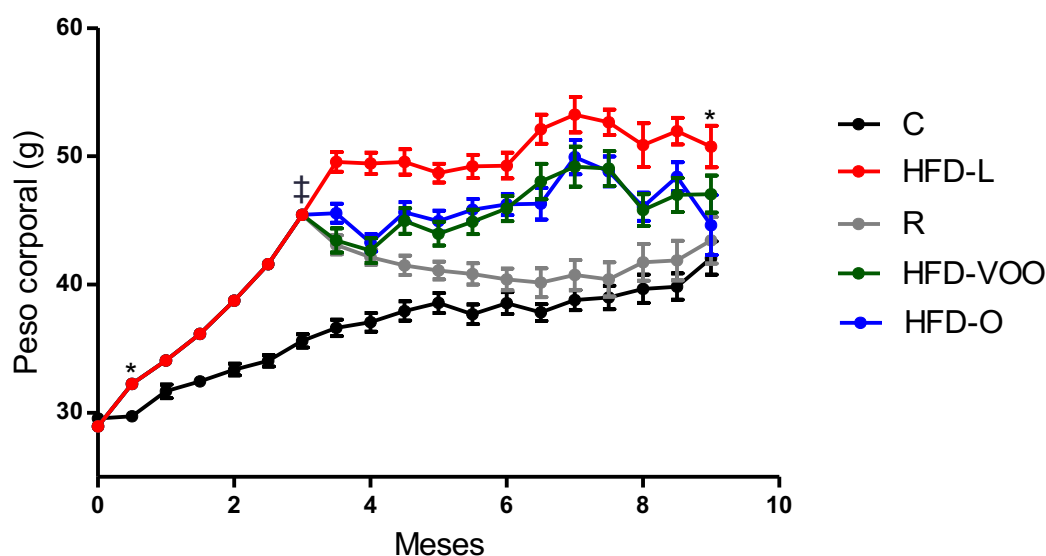


Figura 4.1. Efecto de las dietas HFD sobre la evolución del peso corporal. Los valores, representan la media \pm SEM de 30 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L $*p<0,05$ y $^{\dagger}p<0,001$, con respecto al control y grupos HFD-VOO y HFD-O.

4.1.2 Peso de los órganos extraídos.

Los órganos, que se extrajeron mediante el método descrito en el apartado 1.1.5, se pesaron a las 12 y a las 36 semanas.

4.1.2.1 Peso de la grasa subcutánea.

Con respecto a la grasa subcutánea, la dieta HFD-L incrementó su peso de forma significativa a las 12 y 36 semanas de estudio ($^{\dagger}p<0,001$) respecto al grupo control. Cuando, a las 12 semanas se cambió la composición lipídica (HFD-VOO y HFD-O), se produjo una reducción estadísticamente significativa de las diferencias de los dos grupos con respecto al grupo HFD-L ($^*p<0,05$ y $^{**}p<0,01$ respectivamente) (figura 3.2).

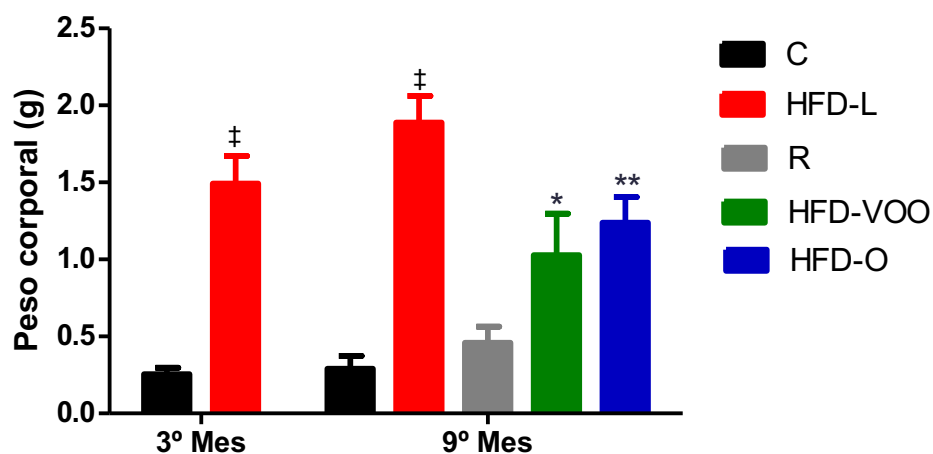


Figura 4.2. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre el peso de la grasa subcutánea. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas de los grupos HFD-L respecto al grupo control ($^{\dagger}p<0,001$) y de los grupos HFD-O ($^*p<0,05$) y HFD-VOO ($^{**}p<0,01$) respecto al grupo HFD-L.

4.1.2.2 Peso de la grasa epididimal.

En la grasa epididimal (figura 4.3), solo encontramos diferencias significativas a las 12 semanas de dieta ($*p<0,05$) entre el grupo control y el grupo HFD-L, pero no se produjeron diferencias significativas entre los grupos al final del estudio (36 semanas).

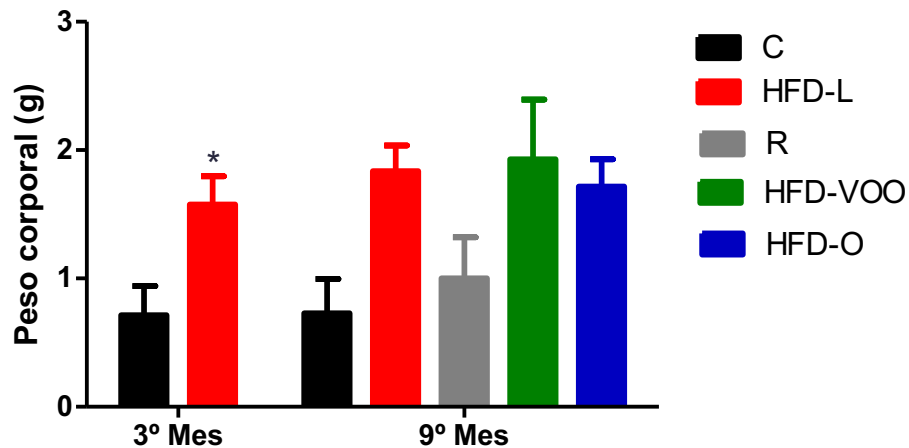


Figura 4.3. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre la grasa epididimal total. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L ($*p<0,05$), con respecto al control.

4.1.2.3 Peso del corazón.

Las dietas hipercalóricas e hiperlipídicas, solo produjeron un incremento del peso del corazón (figura 4.4) en el grupo HFD-L al final del estudio ($*p<0,05$) con respecto al resto de grupos.

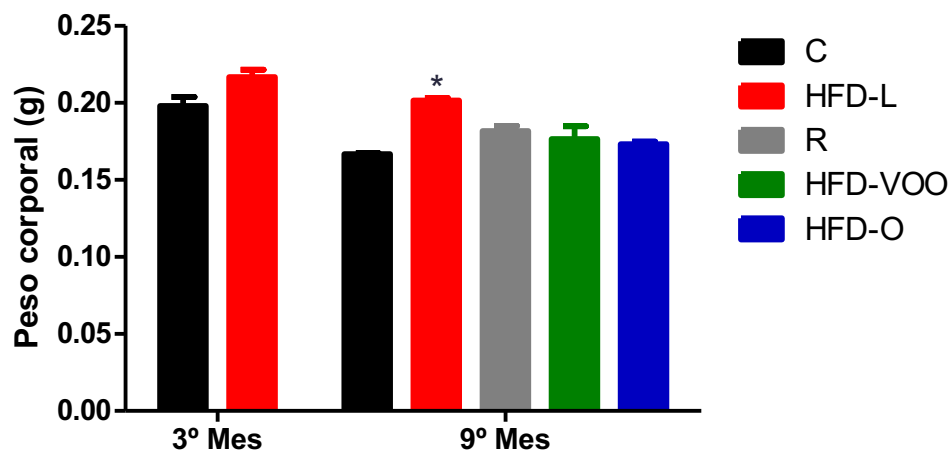


Figura 4.4. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre el peso del corazón. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L (* $p < 0,05$), con respecto al resto de grupos.

4.1.2.4 Peso del hígado.

No se encontró ninguna diferencia significativa en el peso del hígado durante la intervención dietética (figura 4.5).

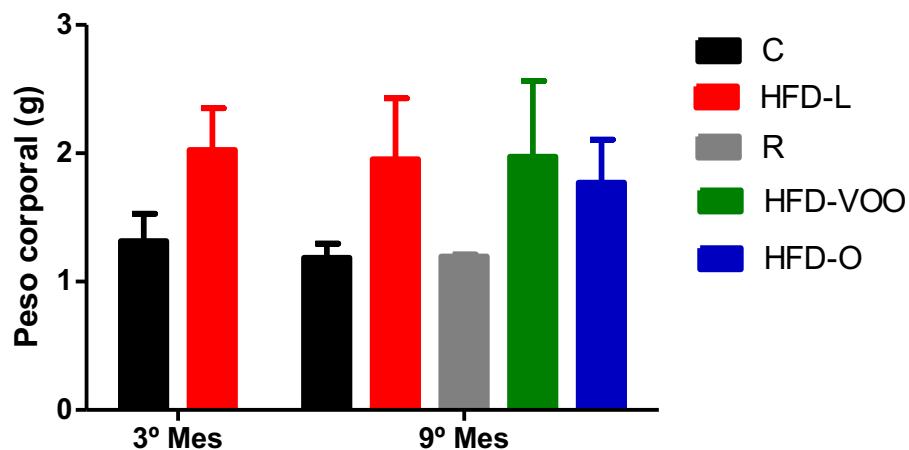


Figura 4.5. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre el peso del hígado. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental.

4.2 Homeostasis de la glucosa.

4.2.1 Medida de glucosa en sangre.

La dieta HFD-L produjo un incremento significativo de la glicemia en ayunas ($^{\dagger}p < 0,001$) con respecto a la dieta control. Cuando en las dietas HFD se modificó su composición lipídica (HFD-VOO y HFD-O), se produjo una reducción significativa ($*p < 0,05$) de la glucemia (figura 4.6).

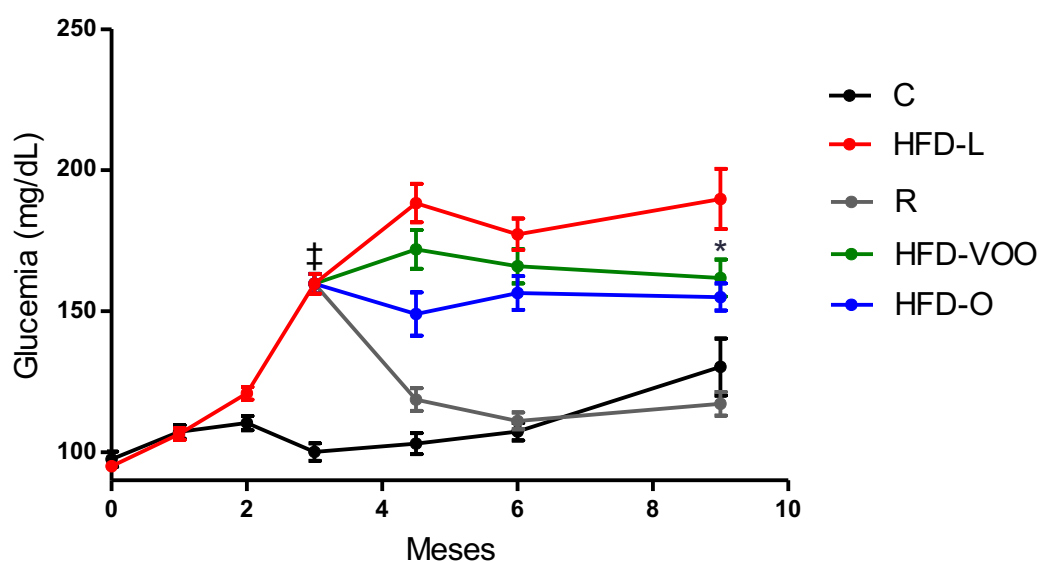


Figura 4.6. Efecto de las dietas HFD durante el estudio en los niveles de glucosa en sangre. Los valores, representan la media \pm SEM de 20 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas de los grupos HFD-L y control ($^{\dagger}p < 0,001$) y entre HFD-VOO y HFD-O con el grupo HFD-L ($*p < 0,05$).

4.2.2 Test de tolerancia a la glucosa.

A las 12 semanas, la dieta HFD-L produjo un incremento significativo de la tolerancia intraperitoneal a la glucosa ($**p < 0,01$ y $^{\dagger}p < 0,001$) con respecto al grupo control (figura 4.7). Al final de la intervención dietética (figura 4.7), cuando en las dietas HFD se modificó su composición lipídica (HFD-VOO y HFD-O), se produjo una reducción significativa ($*p < 0,05$) del grupo HFD-O con respecto a los otros dos grupos HFD, a los 120 min. El grupo reversión mostró los mismos valores que el grupo control.

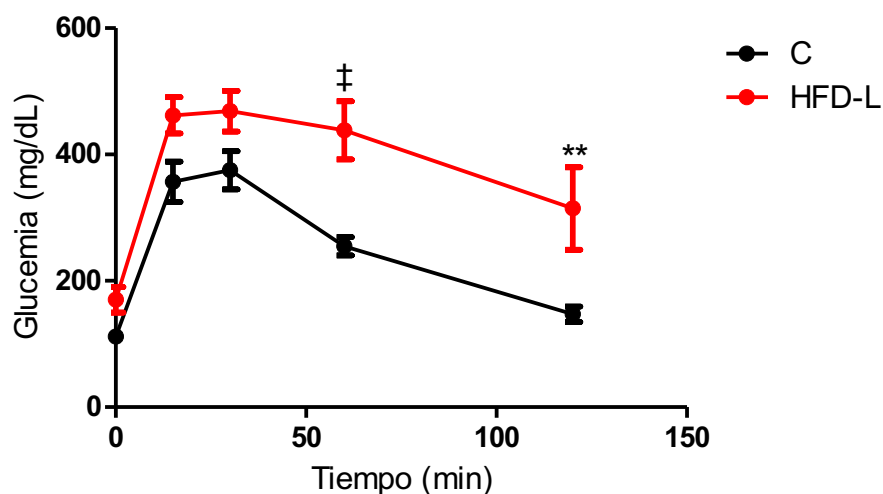


Figura 4.7. Test de tolerancia a la glucosa después de 12 semanas de intervención dietética. Los valores, representan la media \pm SEM de 8 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L ($**p<0,01$ y $^{\dagger}p<0,001$), con respecto al control.

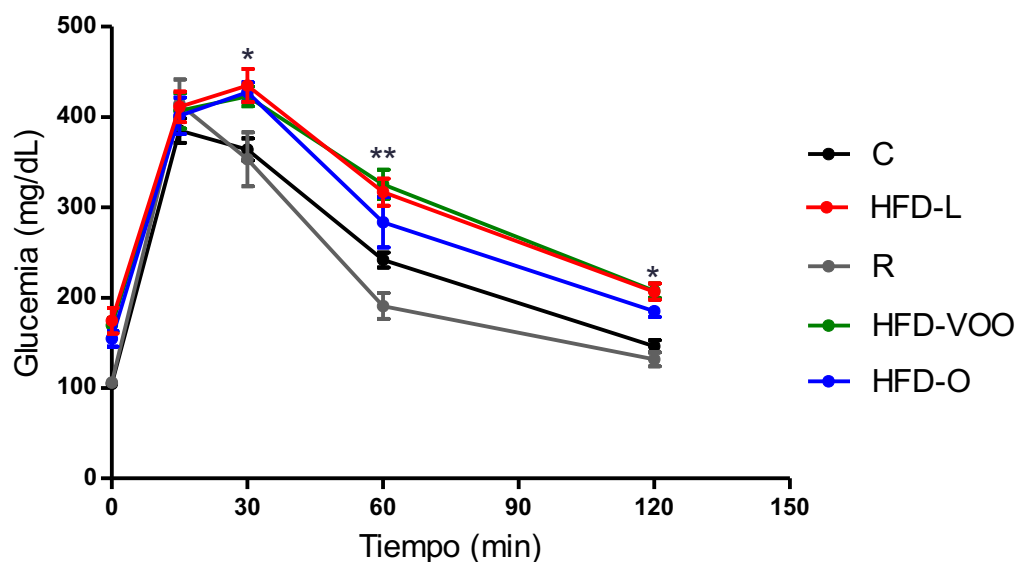


Figura 4.8. Test de tolerancia a la glucosa después de 9 meses de intervención dietética. Los valores, representan la media \pm SEM de 8 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas de los grupos control y reversión (R) con respecto al resto de grupos HFD ($*p<0,05$), a los 30 min. A los

60 min las diferencias fueron entre los grupos HFD-L y HFD-VOO con los grupos C y R (** $p<0,01$). A los 120 min entre los grupos HFD-L y HFD-VOO con los grupos C, R y HFD-O (* $p<0,05$).

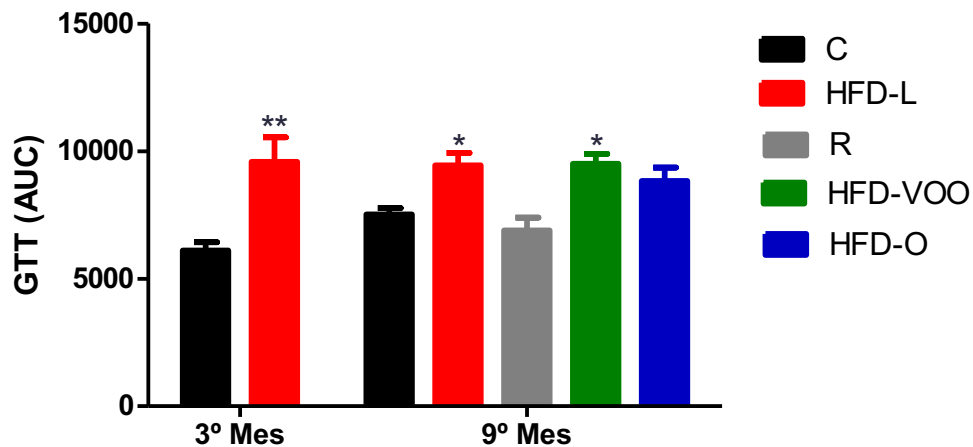


Figura 4.9. Área bajo la curva del test de tolerancia a la glucosa. Esta gráfica, se realizó tomando el área bajo la curva de los test de tolerancia a la glucosa. Los valores, representan la media \pm SEM de 8 ratones en cada grupo experimental. ** $p<0,01$ respecto al grupo control. * $p<0,05$ respecto al grupo C, R y HFD-O.

4.2.3 Medida de insulina en plasma.

La dieta HFD-L produjo un incremento significativo de la insulinemia (* $p<0,05$). Cuando en las dietas HFD se modificó su composición lipídica (HFD-VOO y HFD-O), se produjo una reducción de la insulinemia en plasma, llegando a normalizar los valores cuando se comparan con los animales controles. Lo mismo ocurrió con el grupo R (figura 4.10).

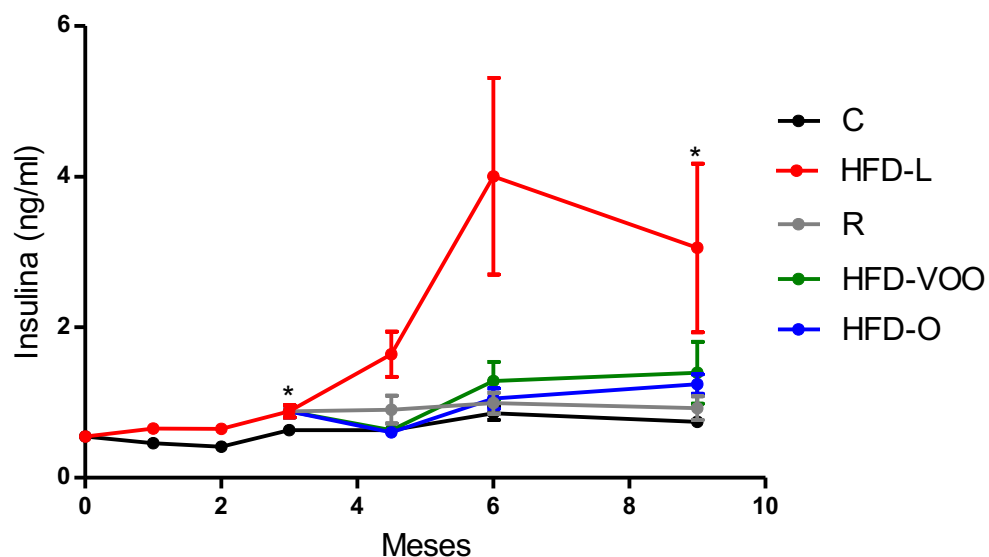


Figura 4.10. Efecto de las dietas HFD durante el estudio en los niveles de insulina en plasma. Los valores, representan la media \pm SEM de 10 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L (* $p < 0,05$), con respecto al resto de grupos.

4.2.4 Test de resistencia a la insulina.

La dieta HFD produjo un incremento significativo de la resistencia a la insulina (Índice HOMA) ($\dagger p < 0,001$). Cuando en esas dietas HFD, se modificó su composición lipídica (HFD-VOO y HFD-O) o se volvió a la dieta control (grupo R), se normalizó la resistencia a la insulina (figura 4.11).

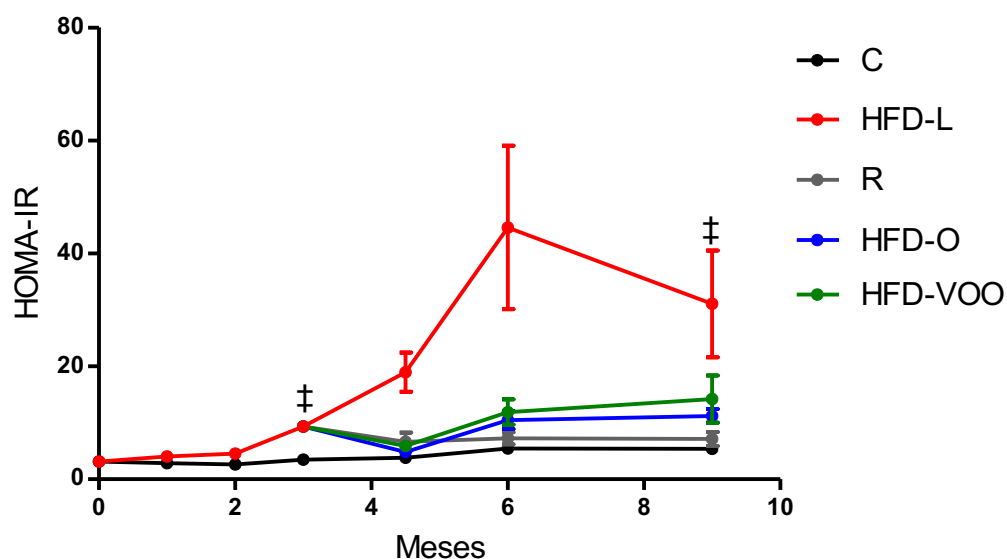


Figura 4.11. Efecto de las dietas HFD durante el estudio en la resistencia a la insulina, representado con el índice HOMA de insulino-resistencia. Los valores, representan la media \pm SEM de 10 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L ($\dagger p<0,001$), con respecto al resto de grupos.

4.2.5 Test de tolerancia a la glucosa midiendo insulina.

A las 12 semanas, la dieta HFD-L produjo un incremento significativo de la tolerancia intraperitoneal a la glucosa, cuando medimos la insulina plasmática ($**p<0,001$) con respecto al grupo control (figura 4.12). Cuando en las dietas HFD, se modificó su composición lipídica (HFD-VOO y HFD-O) o se volvió a la dieta control (grupo R) (figura 4.13) se produjo una reducción significativa ($*p<0,05$ y $**p<0,01$) de los valores de tolerancia intraperitoneal a la glucosa. Estos valores, llegaron a normalizarse.

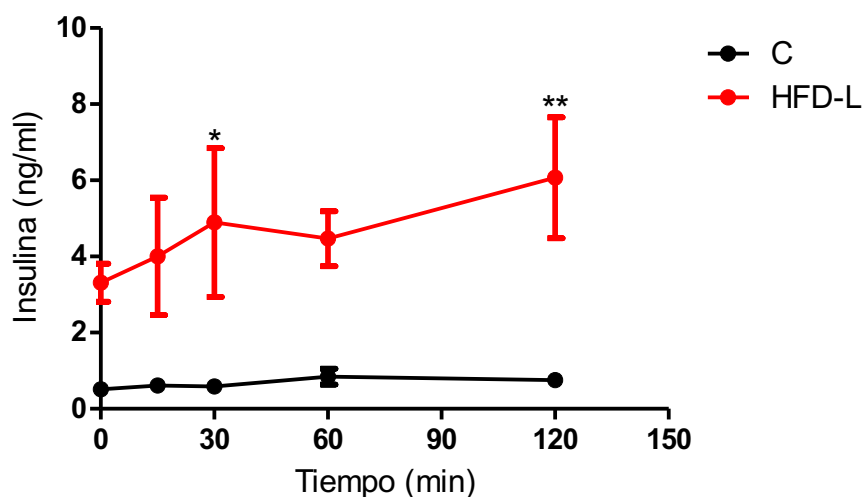


Figura 4.12. Test de tolerancia a la glucosa midiendo insulina después de 3 meses de intervención dietética. Los valores, representan la media \pm SEM de 3 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L ($*p<0,05$ y $**p<0,01$), con respecto al control.

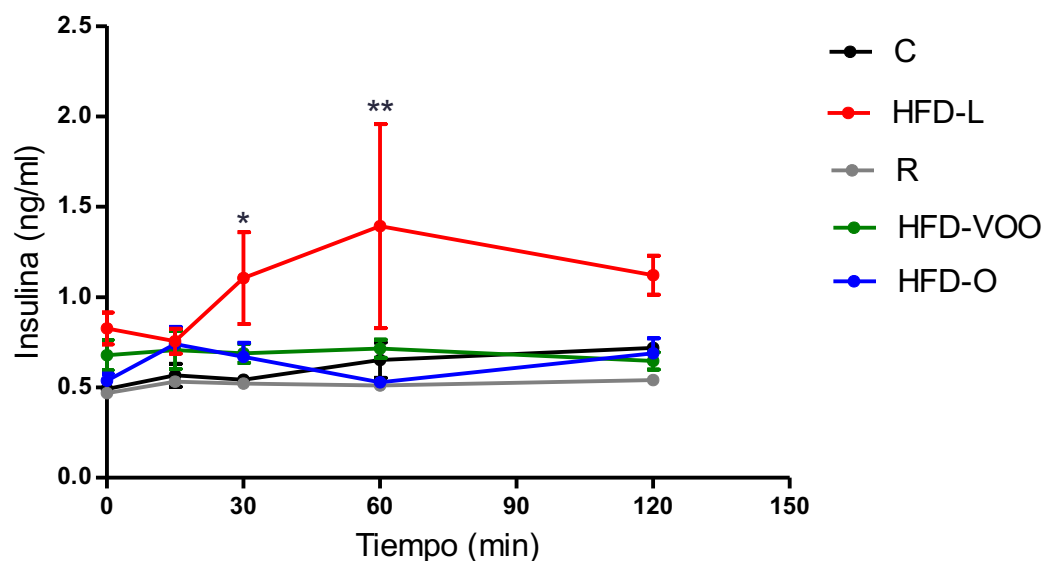


Figura 4.13. Test de tolerancia a la glucosa midiendo insulina después de 9 meses de intervención dietética. Los valores, representan la media \pm SEM de 3 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$), con respecto al resto de grupos.

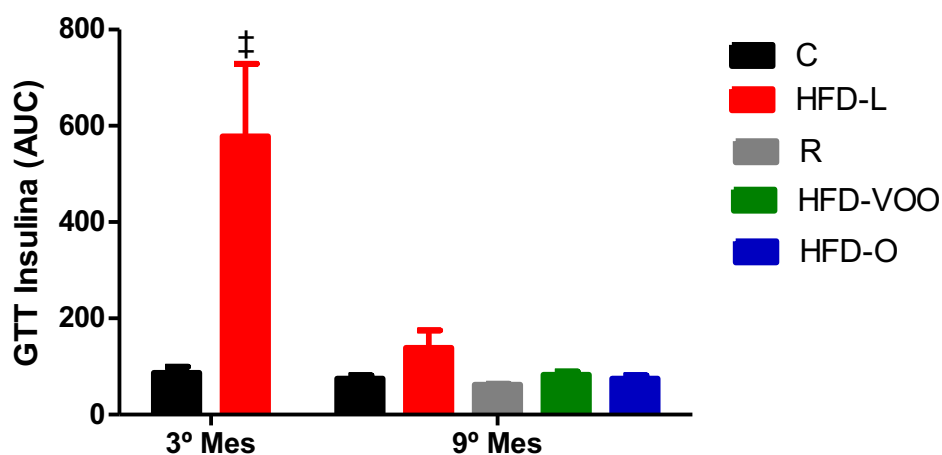


Figura 4.14. Área bajo la curva del test de tolerancia a la glucosa midiendo insulina. Esta gráfica, se realizó tomando el área bajo la curva de los test de tolerancia a la glucosa. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L ($\pm p < 0,001$), con respecto al control.

4.2.6 Test de tolerancia a la insulina.

A las 12 semanas, la dieta HFD-L produjo un incremento significativo de la tolerancia intraperitoneal a la insulina ($**p < 0,001$) con respecto al grupo control (figura 4.15). Cuando en esas dietas, se modificó su composición lipídica (HFD-VOO y HFD-O), se produjo una reducción significativa ($**p < 0,01$) de los valores de tolerancia intraperitoneal a la insulina, con respecto al grupo HFD-L. Estos valores, llegaron a normalizarse en el grupo reversión a los 120 min (figura 4.16).

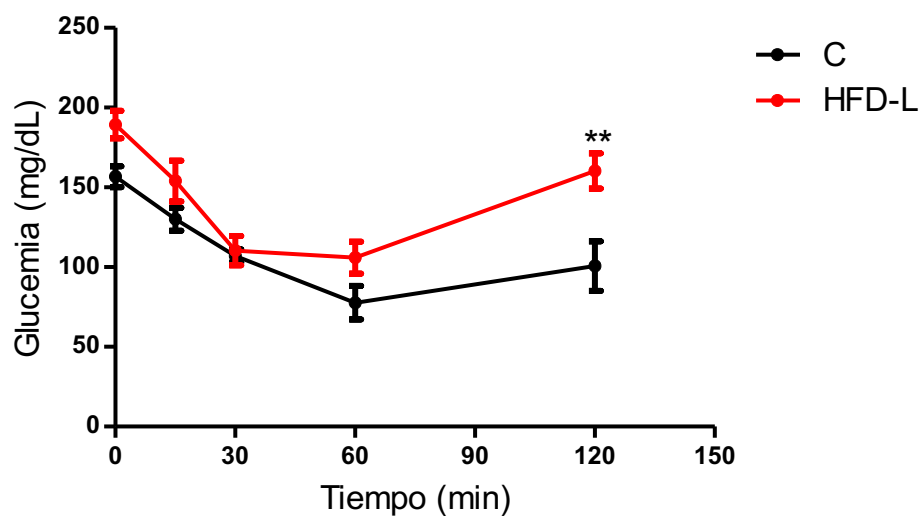


Figura 4.15. Test de tolerancia a la insulina después de 12 semanas de intervención dietética. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvo diferencia significativa del grupo HFD-L ($**p < 0,01$), con respecto al control.

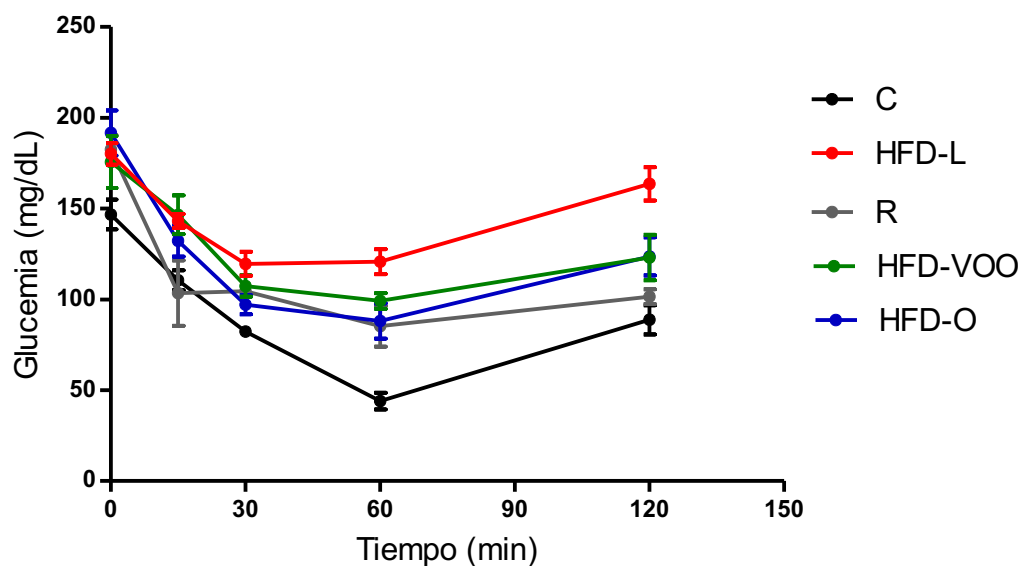


Figura 4.16. Test de tolerancia a la insulina después de 36 semanas de intervención dietética. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvo diferencia significativa del grupo HFD-L ($*p<0,05$) con el grupo R y a los otros grupos HFD a partir del minuto 60. Cuando se compara el grupo HFD-L con respecto al grupo control, la diferencia fue de $**p<0,01$.

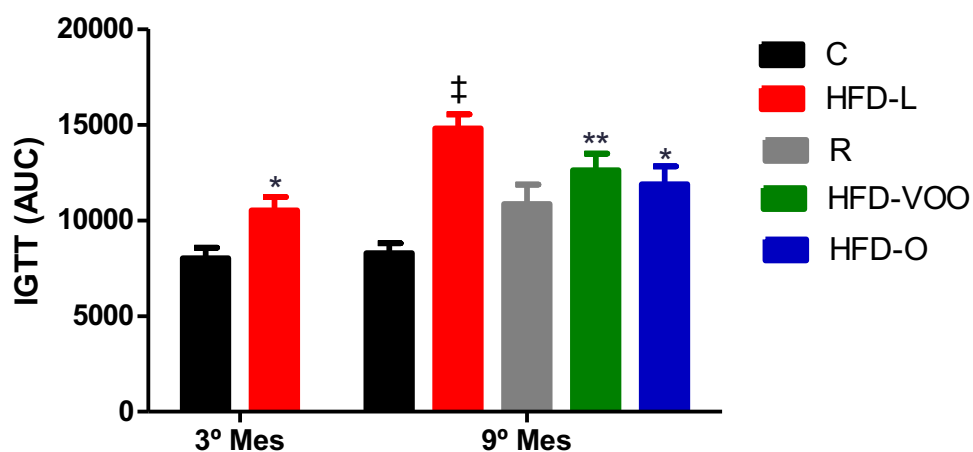


Figura 4.17. Área bajo la curva del test de tolerancia a la insulina. Esta gráfica, se realizó tomando el área bajo la curva de los test de tolerancia a la insulina. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas de los grupos HFD-L ($*p<0,05$) con respecto al grupo control a las 12 semanas, del grupo HFD-L

($\dagger p < 0,001$) con respecto al control a los 9 meses y de los grupos HFD-VOO ($**p < 0,01$) y HFD-O ($*p < 0,05$), con respecto al control, a los 9 meses.

4.2.7 Estímulo secreción de insulina y contenido de insulina.

A las 12 semanas, la dieta HFD-L no afectó a la cantidad total de secreción de insulina liberada en respuesta a glucosa (figura 4.18). En cambio produjo un retraso en el umbral de secreción de insulina en presencia de glucosa, en el grupo HFD-L ($EC_{50} = 17,6$ mM) respecto al grupo control ($EC_{50} = 11,8$ mM; $*p < 0,01$). A los 9 meses de intervención dietética (figura 4.19), el grupo HFD-L tenía un retraso en el umbral de secreción de insulina, conjuntamente con una disminución significativa de liberación de insulina en presencia de concentraciones estimuladoras máximas de glucosa ($\dagger p < 0,001$), al compararlo con el grupo control y los grupos HFD-VOO y HFD-O. El grupo reversión (R) se comportó de un modo similar al grupo HFD-L.

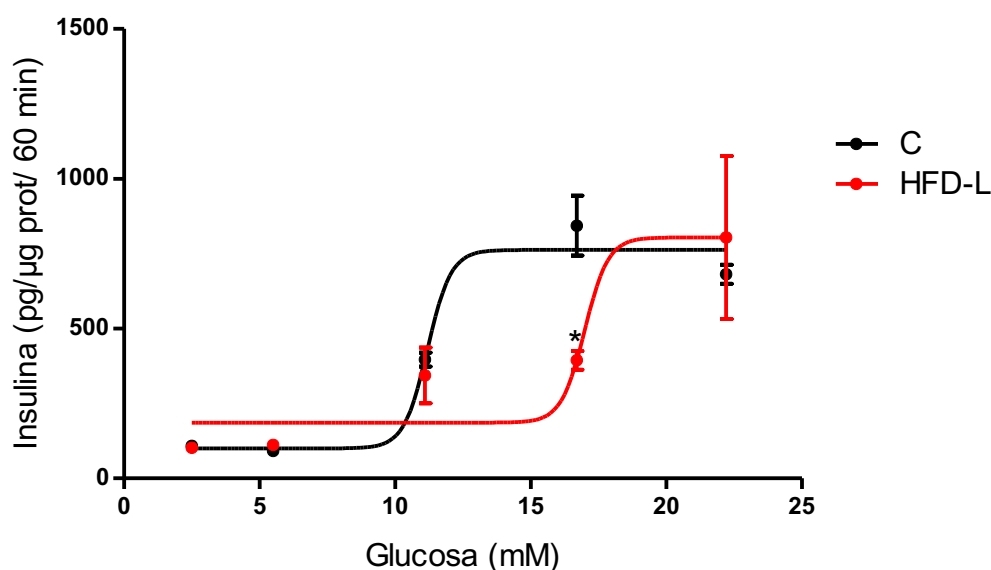


Figura 4.18. Estímulo de secreción de insulina en presencia de glucosa después de 3 meses de intervención dietética. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvo diferencia significativa del grupo HFD-L ($**p < 0,01$), con respecto al control.

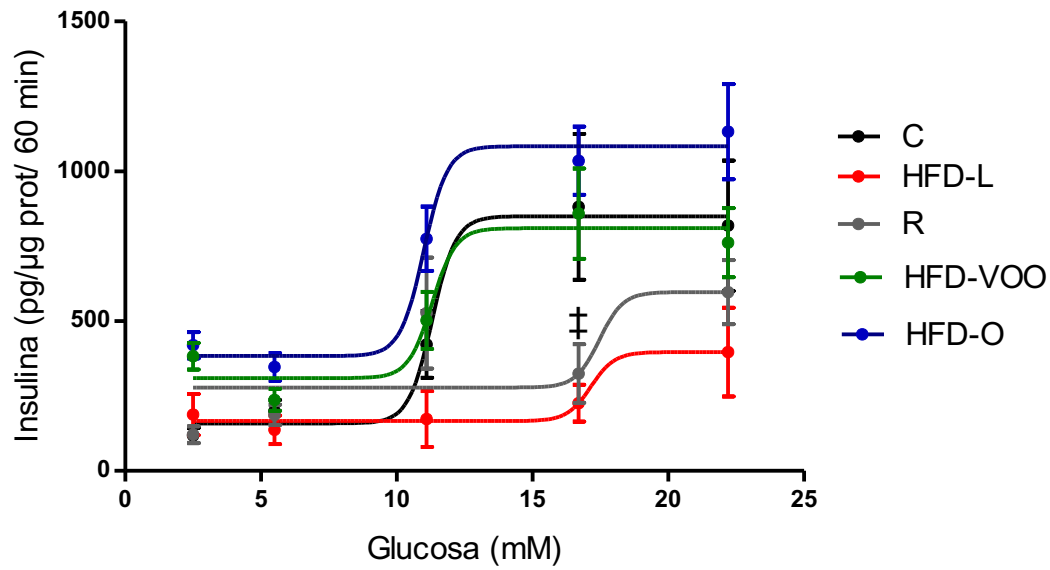


Figura 4.19. Estímulo de secreción de insulina en presencia de glucosa después de 9 meses de intervención dietética. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvo una diferencia significativa de los grupos HFD-L y reversión ($^{\dagger}p < 0,001$), con respecto al control y los grupos HFD-VOO y HFD-O.

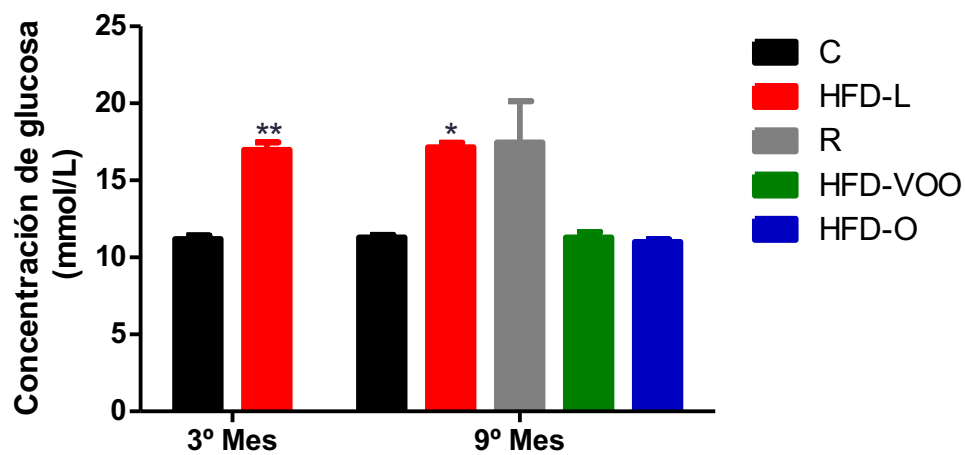


Figura 4.20. Valores de las concentraciones estimulatorias medias de glucosa a los 3 y 9 meses de la intervención dietética. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. A los 3 meses, se obtuvo una diferencia significativa del grupo HFD-L respecto al grupo control ($**p<0,01$). A los 9 meses, se obtuvo una diferencia significativa ($*p<0,001$) de los grupos HFD-L y R con respecto a los grupos C, HFD-VOO y HFD-O.

En lo que se refiere al contenido de insulina (figura 4.21), a los 3 meses había en el grupo HFD-L una cantidad de insulina significativamente menor ($*p<0,05$) con respecto al grupo control. A los 9 meses, los grupos HFD-EVOO y HFD-O recuperaron su contenido de insulina al compararlos con el grupo control. En cambio, los grupos HFD-L y R tenían un contenido de insulina significativamente menor ($**p<0,01$) (figura 2.21).

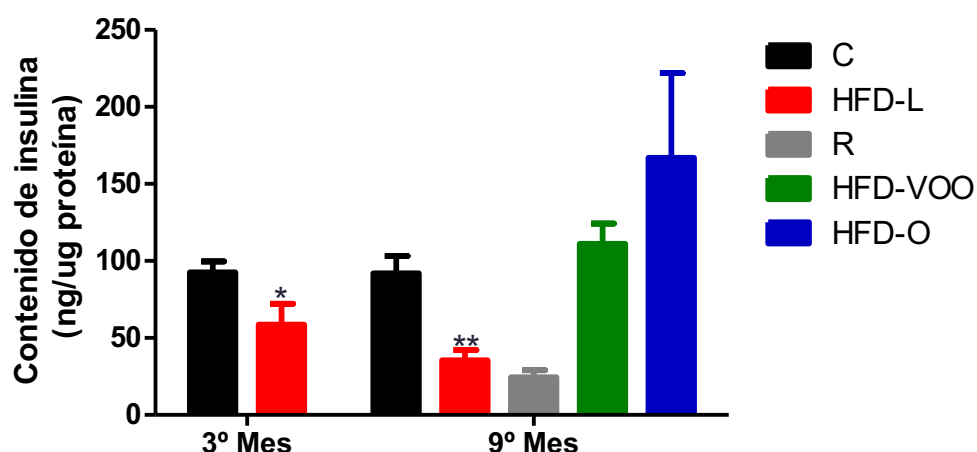


Figura 4.21. Valores del contenido de insulina a los 3 y 9 meses de la intervención dietética. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. A los 3 meses, se obtuvo una diferencia significativa del grupo HFD-L respecto al grupo control ($*p<0,05$). A los 9 meses se obtuvo una diferencia significativa ($**p<0,01$) de los grupos HFD-L y R con respecto a los grupos C, HFD-VOO y HFD-O.

4.2.8. Estudios de apoptosis en los islotes pancreáticos.

La dieta HFD-L a los 3 meses no afectó a la apoptosis de las células de los islotes. En cambio, a los 9 meses se produjo un incremento significativo de la apoptosis ($^{\ddagger}p<0,001$). La modificación de los perfiles de grasas de los grupos HFD (HFD-VOO y HFD-O), así como la reversión a la dieta control normalizó los niveles de apoptosis (figuras 4.22 y 4.23).

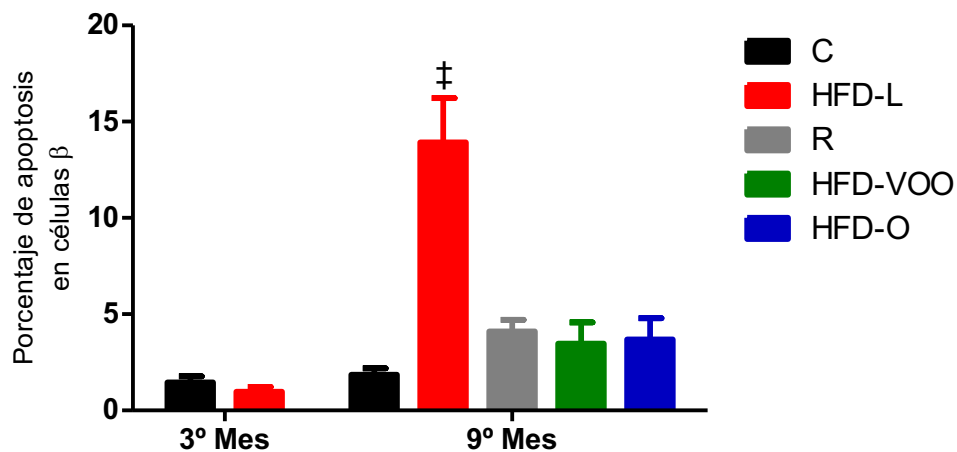


Figura 4.22. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre la apoptosis en las células beta. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. A los 3 meses no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales. A los 9 meses del grupo HFD-L mostró una diferencia significativa ($^{\ddagger}p<0,001$) con respecto al resto de grupos

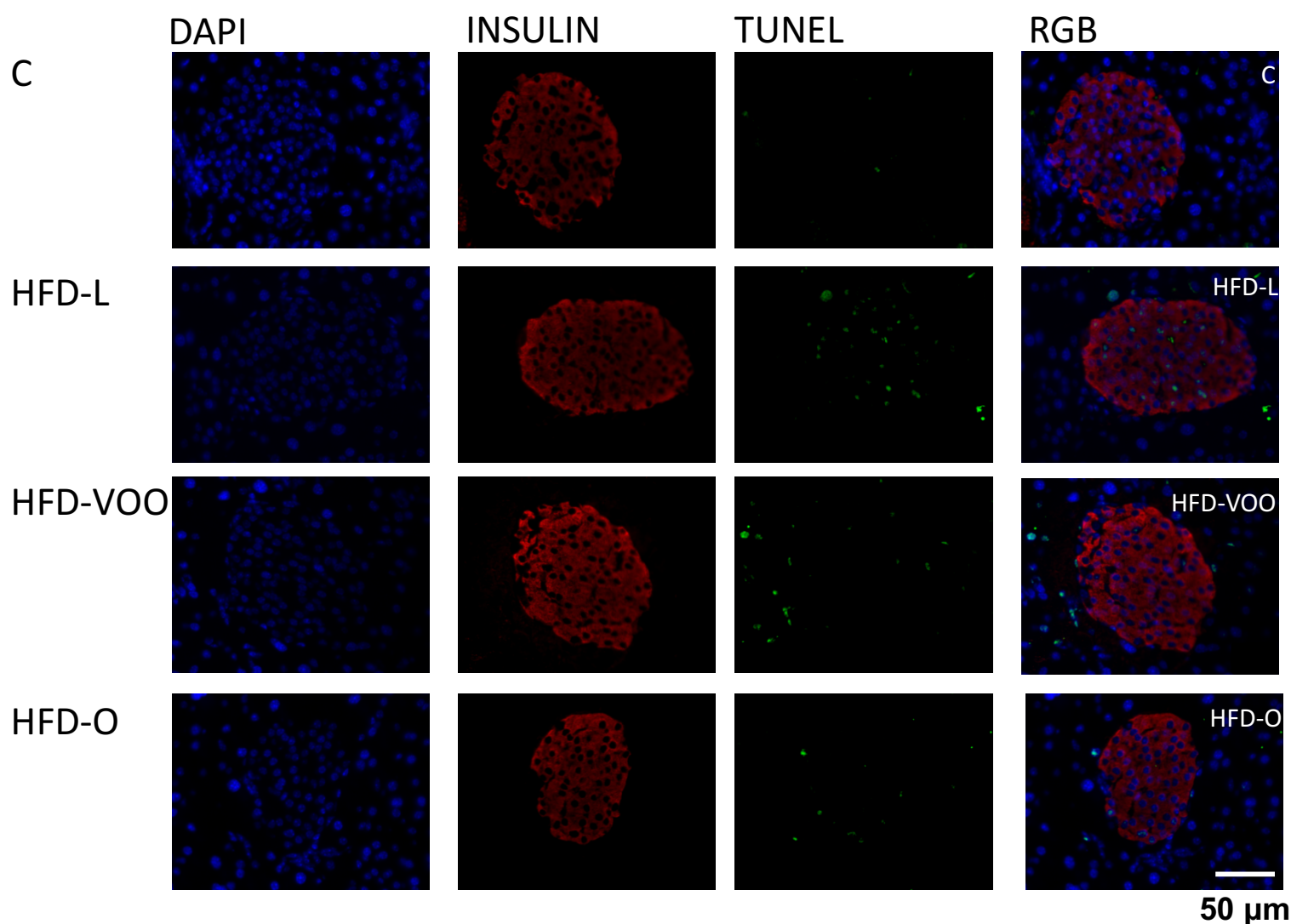


Figura 4.23. Imagen representativa mostrando inmunohistoquímica para insulina y ensayo de TUNEL de apoptosis en los islotes pancreáticos, de los animales sometidos a distintas dietas HFD a las 36 semanas. Se muestra una imagen representativa de microscopía confocal. En la parte derecha de los paneles se indican los distintos grupos experimentales de animales. Azul es tinción nuclear con DAPI; Rojo indica células positivas para insulina; Verde indica células positivas para apoptosis y RGB se refiere a la imagen de superposición de las tres columnas anteriores. La barra de escalas indica la unidad de medida.

4.3 Perfil lipídico y medición de hormonas.

4.3.1 Medida y determinación de colesterol.

La dieta HFD-L produjo un incremento significativo ($^{\dagger}p<0,001$) del colesterol total y del LDL, así como una disminución significativa ($^{\dagger}p<0,001$) del colesterol HDL (figuras 4.24-4.26) con respecto al grupo control. Cuando en esa dieta se modificó su composición lipídica (HFD-VOO) se produjo una disminución significativa de los valores de colesterol total y LDL ($*p<0,05$) con respecto al grupo HFD-L, sin modificarse los niveles de colesterol HDL. En el grupo HFD-O se normalizaron los niveles de colesterol total y LDL y se produjo un aumento significativo ($**p<0,01$) de los niveles de colesterol HDL (figuras 4.24-4.26).

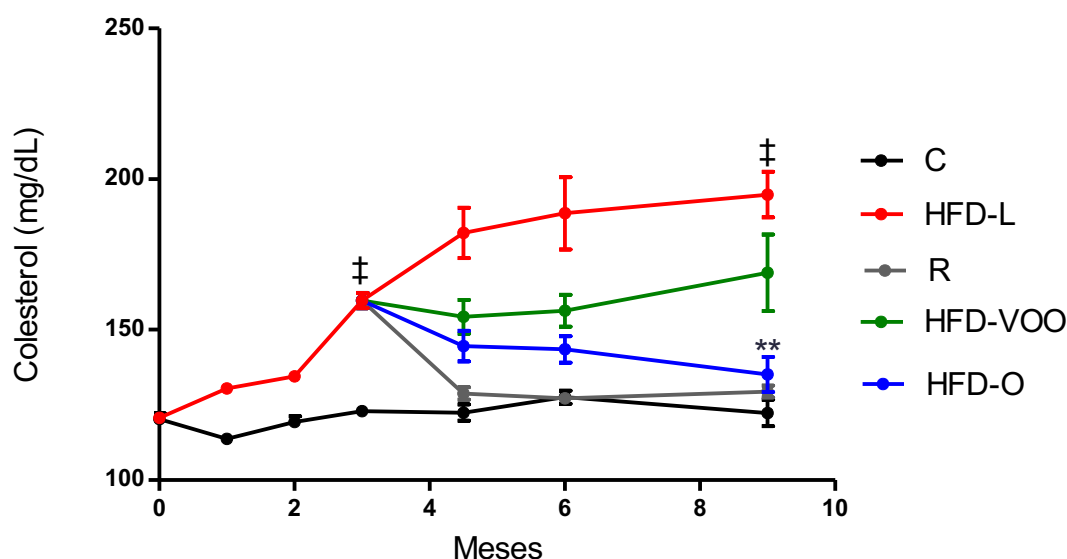


Figura 4.24. Efecto de las dietas HFD durante el estudio en los niveles de colesterol total en sangre. Los valores representan, la media \pm SEM de 20 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L ($^{\dagger}p<0,001$), con respecto al control, del grupo HFD-VOO con respecto al grupo HFD-L ($*p<0,05$) y del grupo HFD-O con respecto al grupo HFD-L ($**p<0,01$).

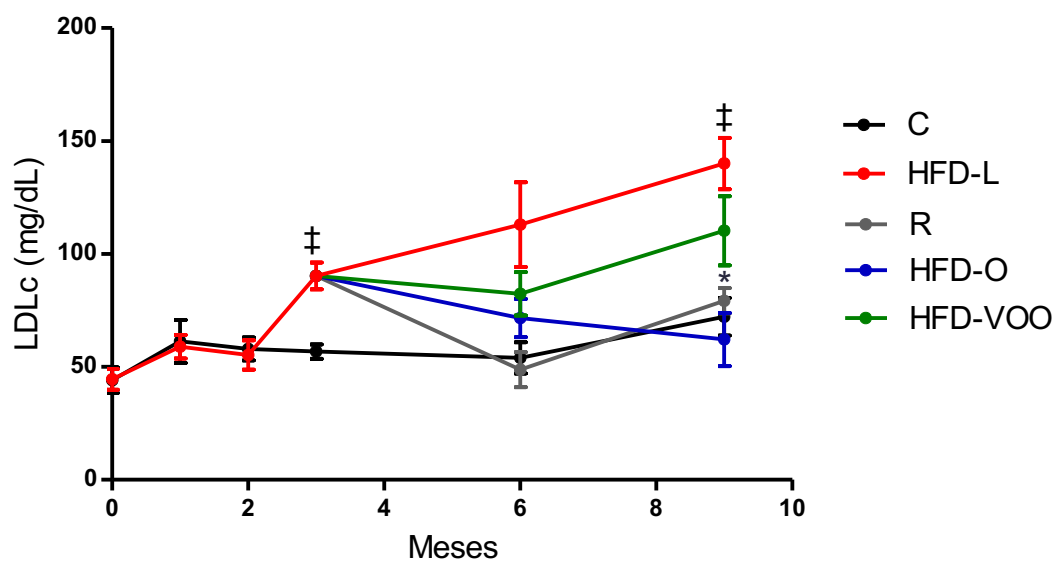


Figura 4.25. Efecto de las dietas HFD durante el estudio en los niveles de colesterol LDL en sangre. Los valores, representan la media \pm SEM de 20 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L ($^{\dagger}p<0,001$), con respecto al control, del grupo HFD-VOO con respecto al grupo HFD-L ($^*p<0,05$) y del grupo HFD-O con respecto al grupo HFD-L ($^{**}p<0,01$).

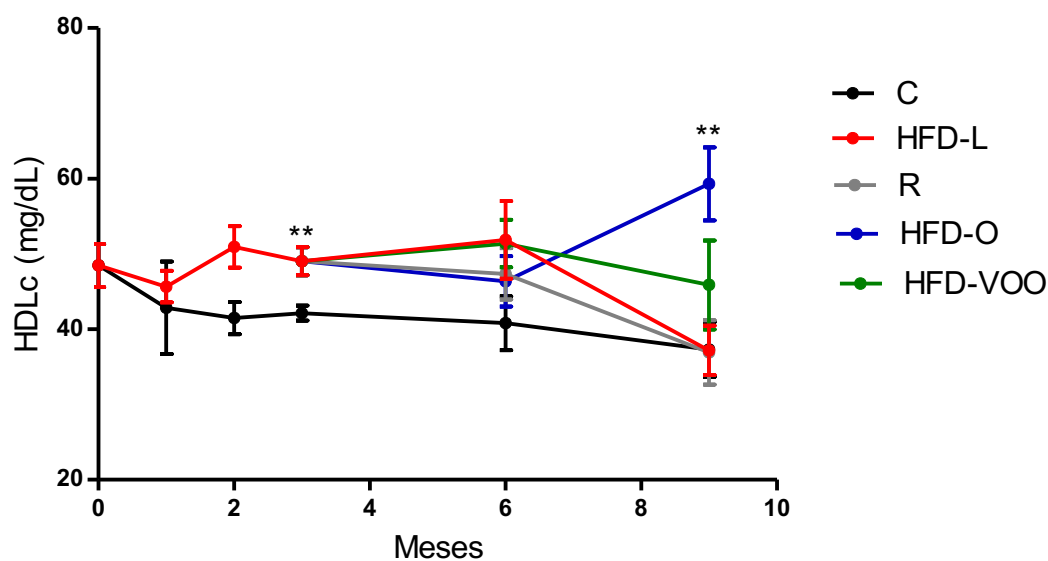


Figura 4.26. Efecto de las dietas HFD durante el estudio en los niveles de colesterol HDL en sangre. Los valores, representan la media \pm SEM de 20 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L, y el grupo HFD-O con respecto al control (** $p < 0,01$).

4.3.2 Leptina.

La dieta HFD-L produjo un incremento significativo de los niveles circulantes de leptina ($^{\dagger}p < 0,001$) con respecto al grupo control. Cuando en esas dietas, se modificó su composición lipídica (HFD-VOO y HFD-O) no se modificaron los niveles circulantes de leptina. Solo la vuelta a una dieta control (grupo R) redujo significativamente los niveles de leptina (figura 4.27).

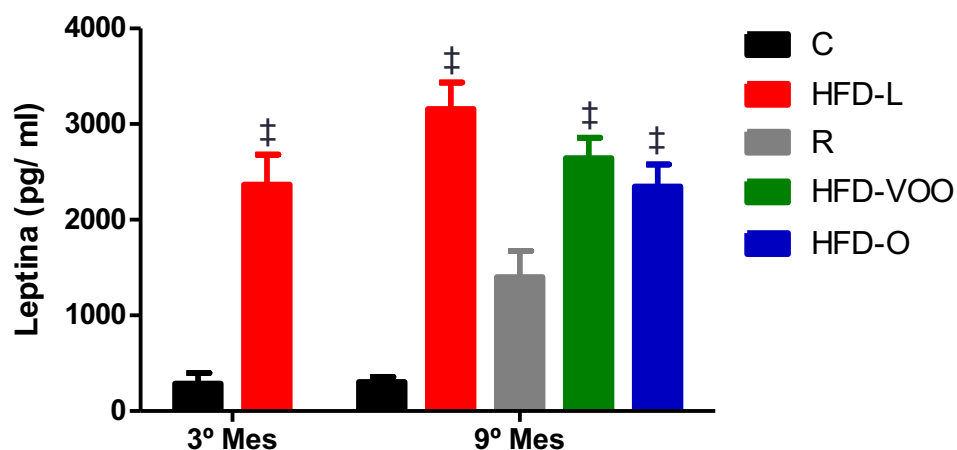


Figura 4.27. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de leptina plasmáticos. Los valores, representan la media \pm SEM de 10 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas de los grupos HFD con respecto a los grupos control y reversión ($^{\dagger}p < 0,001$).

4.4 Determinación del estado inflamatorio.

4.4.1 Parámetros inflamatorios plasmáticos.

La dieta HFD-L produjo un incremento significativo de los niveles de IFN- γ a los 3 meses ($*p<0,05$) y a los 9 meses ($^{\ddagger}p<0,001$) con respecto al grupo control. La modificación de los perfiles grasos de las HFD (HFD-VOO y HFD-O), al igual que la vuelta a la dieta control normalizaron sus niveles (figura 4.28). En el caso de la IL-6, a los 3 meses la dieta HFD-L elevó significativamente sus niveles ($^{\ddagger}p<0,001$). A los 9 meses todas las dietas HFD tenían los niveles de IL-6 elevados (figura 4.29). Los niveles de IL-1 β (figura 4.30) y TNF- α (figura 4.31) no se modificaron con ninguna de las dietas, ni con el paso del tiempo.

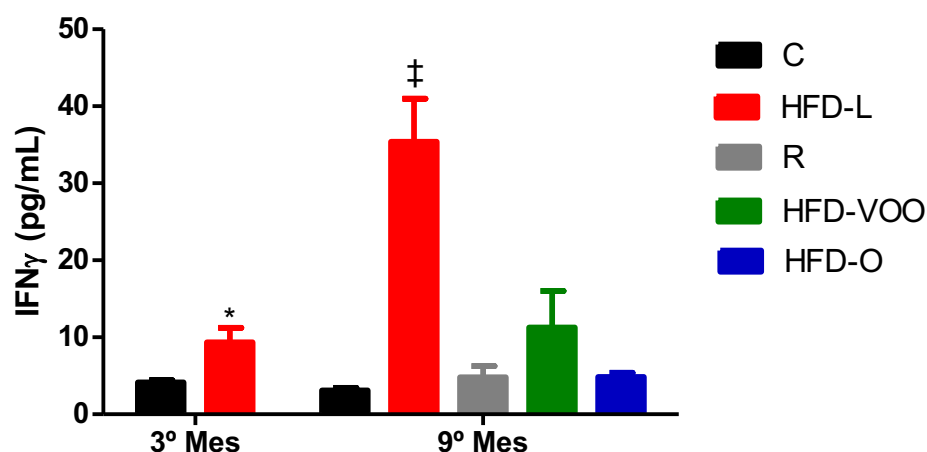


Figura 4.28. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de IFN- γ plasmáticos. Los valores, representan la media \pm SEM de 10 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L, con respecto al control ($*p<0,05$ y $^{\ddagger}p<0,001$).

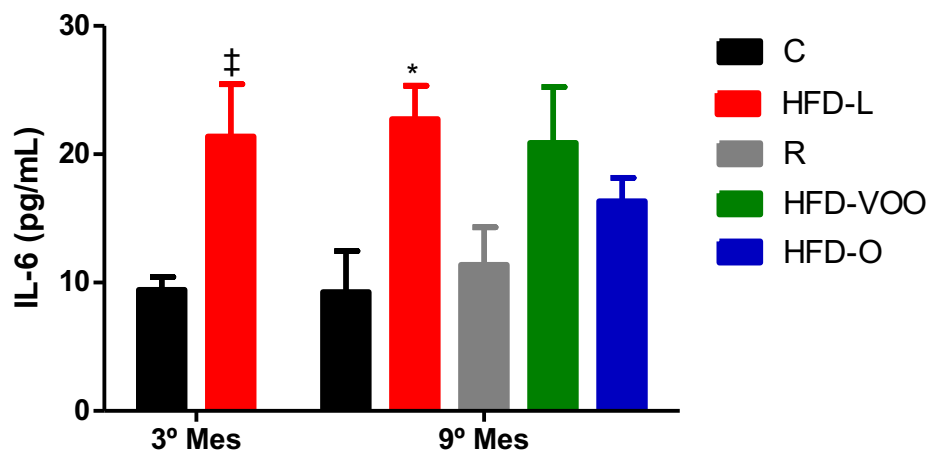


Figura 4.29. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de IL-6 plasmáticos. Los valores, representan la media \pm SEM de 10 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L, con respecto al control ($^*p<0,05$ y $^{\ddagger}p<0,001$).

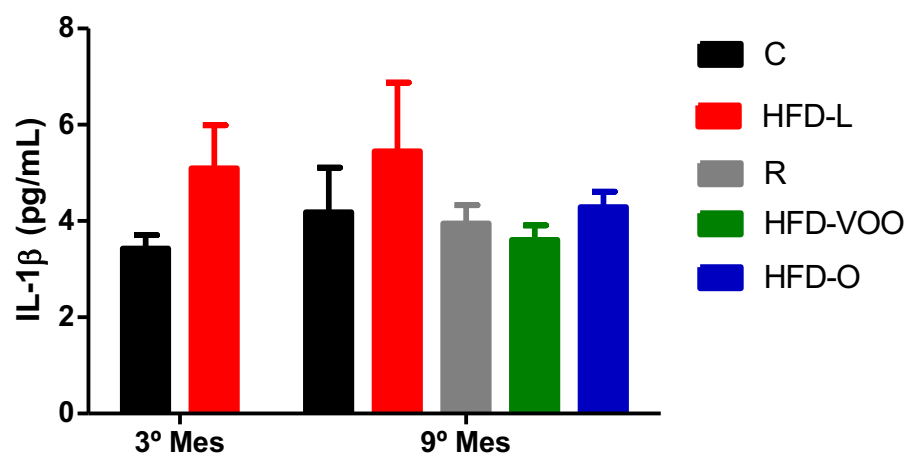


Figura 4.30. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de IL-1 β plasmáticos. Los valores, representan la media \pm SEM de 10 ratones en cada grupo experimental. No se produjeron diferencias significativas entre los grupos.

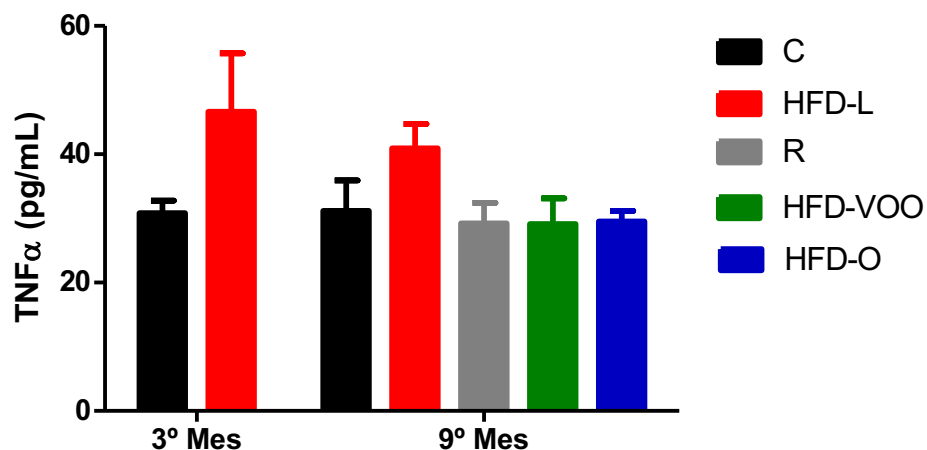


Figura 4.31. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de TNF- α plasmáticos. Los valores, representan la media \pm SEM de 10 ratones en cada grupo experimental. No se produjeron diferencias significativas entre los grupos.

4.4.2 Parámetros inflamatorios en el tejido adiposo subcutáneo.

En el caso del tejido adiposo, solo se produjo un incremento significativo ($*p < 0,05$) en el grupo HFD-L con respecto al grupo control para la IL-6 (figura 4.33), no modificándose el resto de citoquinas (figuras 4.32 y 4.34).

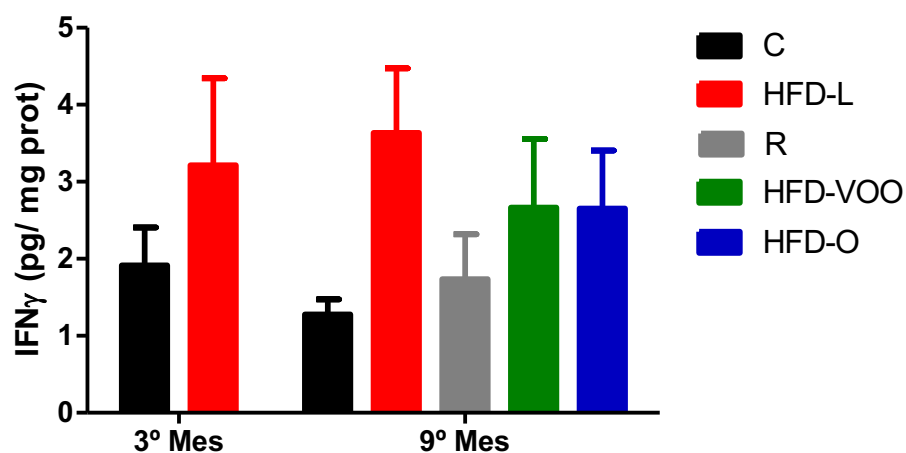


Figura 4.32. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de IFN- γ en el tejido adiposo subcutáneo. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

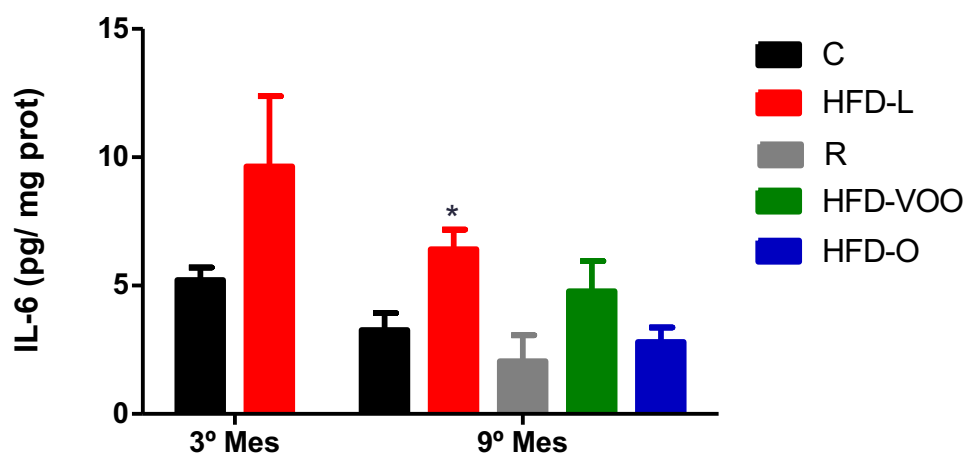


Figura 4.33. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de IL-6 en el tejido adiposo subcutáneo. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L, con respecto al control y reversión (* $p < 0,05$).

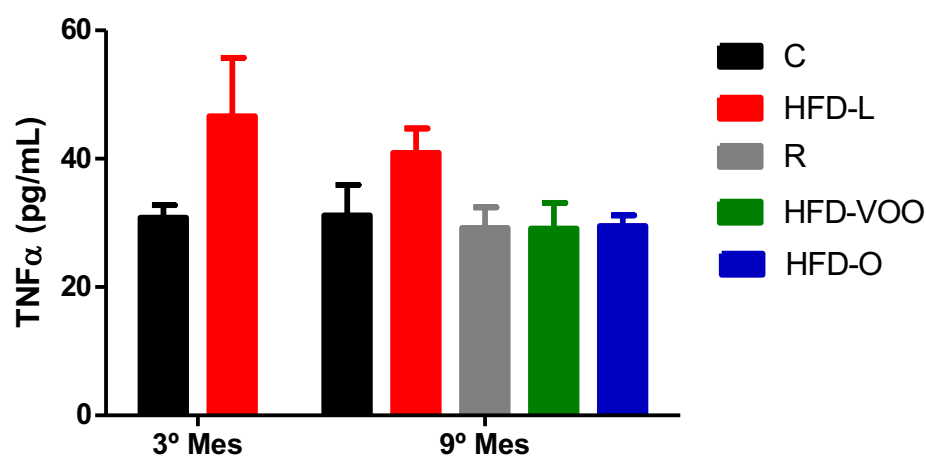


Figura 4.34. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de TNF- α en el tejido adiposo subcutáneo. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

4.4.3 Parámetros inflamatorios en el tejido adiposo epididimal.

La dieta HFD-L incrementó significativamente los niveles de IFN- γ , con respecto al grupo control ($*p<0,05$ a los meses; $**p<0,01$ a los 9 meses. La modificación del perfil de las grasas (grupos HFD-VOO y HFD-O) o la reversión normalizaron los niveles de la citoquina (figura 4.35). Para la IL-6, a los 3 meses la dieta HFD-L incrementó significativamente ($*p<0,05$) sus valores, con respecto al grupo control. A los 9 meses, los niveles de IL-6 estaban normalizados en todos los grupos (figura 4.36). Los valores de la TNF- α no se modificaron en ninguna de las circunstancias (figura 4.37).

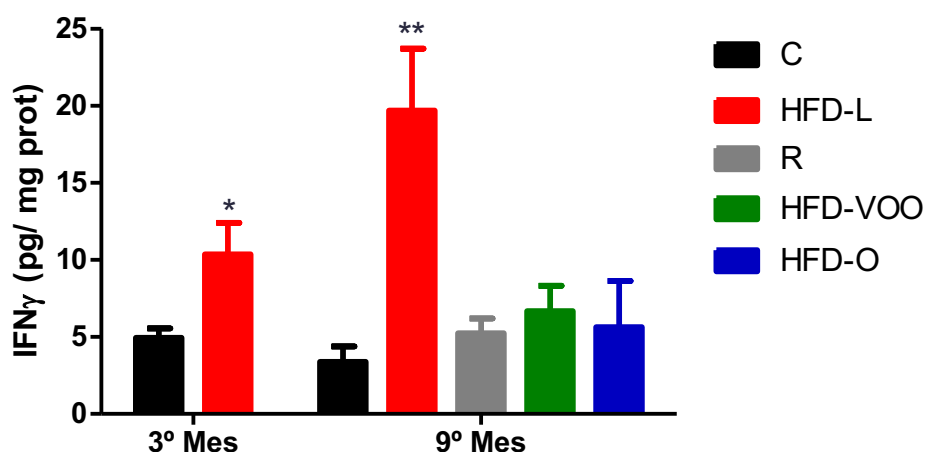


Figura 4.35. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de IFN- γ en el tejido adiposo epididimal. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L, con respecto al control ($*p<0,05$) a los 3 meses. A los 9 meses las diferencias significativas fueron entre el grupo HFD-L y el resto de los grupos ($**p<0,01$).

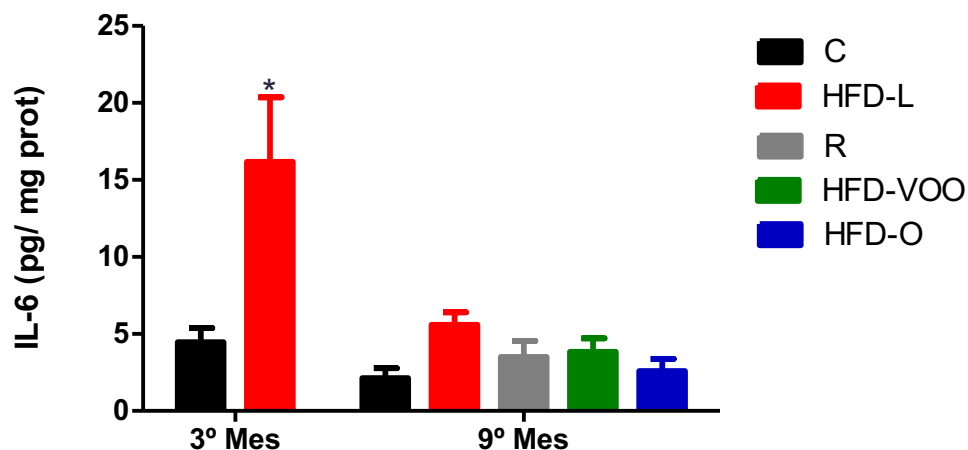


Figura 4.36. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de IL-6 en el tejido adiposo epididimal. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L con respecto al control (* $p < 0,05$).

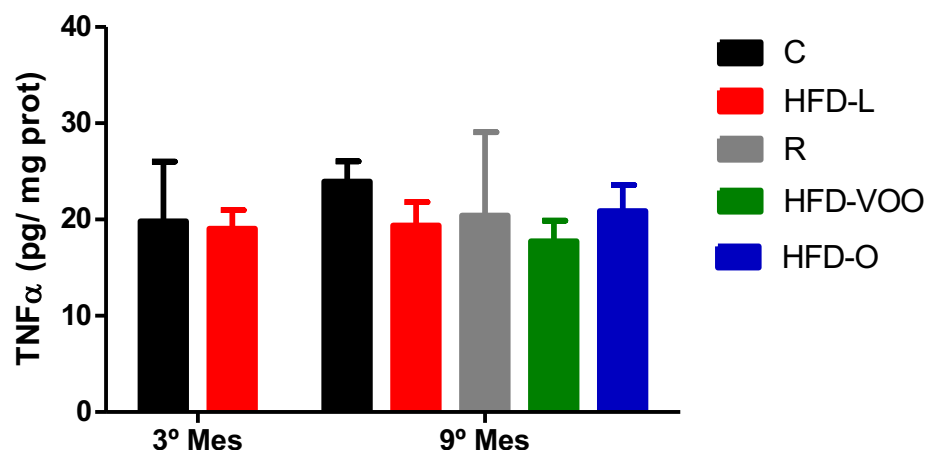


Figura 4.37. Efecto de las dietas HFD a 12 y 36 semanas sobre los niveles de TNF- α en el tejido adiposo subcutáneo. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

4.4.4 Expresión de marcadores de inflamación en macrófagos del tejido graso epididimal.

Hemos examinado la expresión de diversos marcadores de inflamación (figuras 4.38-4.40) en macrófagos y como resultado hemos obtenido un aumento significativo de la expresión de F4/80+ ($*p<0,05$), CD11b ($**p<0,01$) y CD11c ($^{\dagger}p<0,001$) en el tejido adiposo del grupo HFD-L, con respecto al resto al grupo control. El paso a las dietas HFD-VOO, HFD-O o R normalizó los niveles de todos los marcadores.

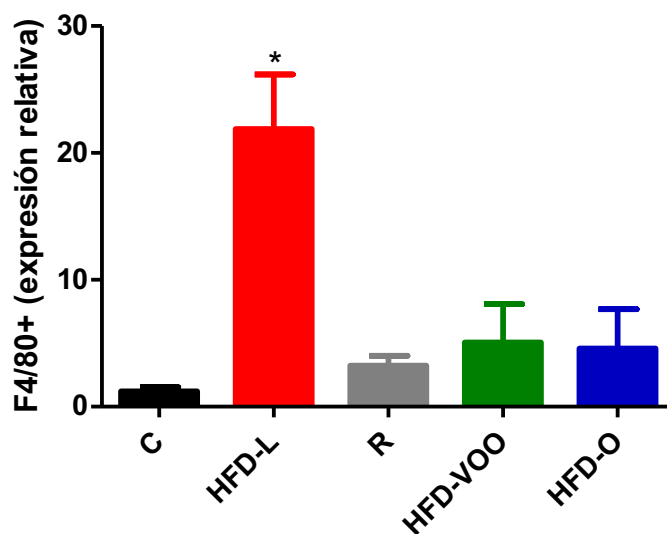


Figura 4.38. Efecto de las dietas HFD a las 36 semanas sobre los niveles de expresión del marcador macrofágico f4/80+, en el tejido adiposo epididimal. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L, con respecto al resto de grupos ($*p<0,05$).

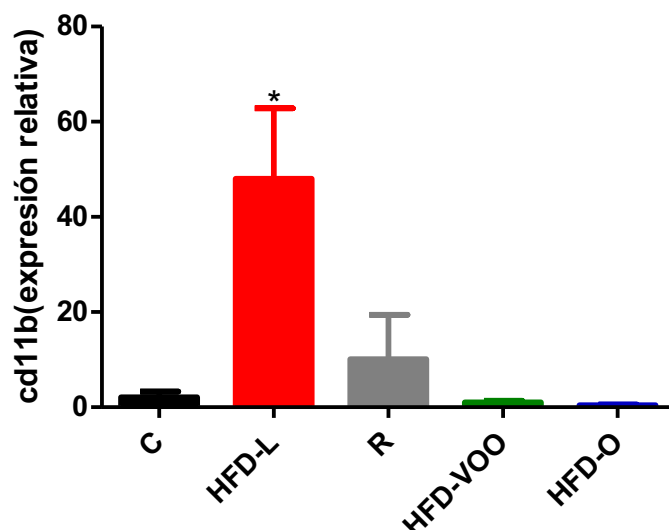


Figura 4.39. Efecto de las dietas HFD a las 36 semanas sobre los niveles de expresión del marcador macrofágico CD11b, en el tejido adiposo epididimal. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L, con respecto al resto de grupos (** $p < 0,01$).

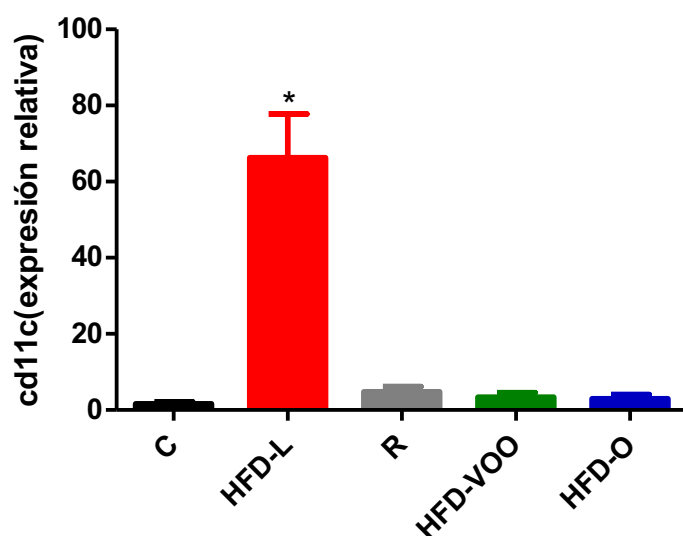


Figura 4.40. Efecto de las dietas HFD a las 36 semanas sobre los niveles de expresión del marcador macrofágico CD11c, en el tejido adiposo epididimal. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo HFD-L, con respecto al resto de grupos ($^{\dagger}p < 0,001$).

4.5 Estudios en tejido adiposo.

4.5.1 Tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo y epididimal.

La dieta HFD-L produjo, en el tejido adiposo subcutáneo un aumento significativo ($^{\dagger}p<0,001$) en el tamaño de los adipocitos en ese grupo con respecto al grupo control, a los 3 y 9 meses. A los 9 meses la vuelta a una dieta control redujo significativamente el tamaño de los adipocitos ($^{\dagger}p<0,001$). Finalmente, el cambio a una dieta HFD-O también redujo significativamente el tamaño de los adipocitos ($*p<0,05$) (figura 4.41).

En el tejido adiposo epididimal la dieta HFD-L produjo un aumento significativo ($^{\dagger}p<0,001$) en el tamaño de los adipocitos en ese grupo con respecto al grupo control, a los 3 y 9 meses. A los 9 meses solo se observó una reducción significativa ($**p<0,01$) en el tamaño de los adipocitos al pasar a la dieta HFD-O (figura 3.42).

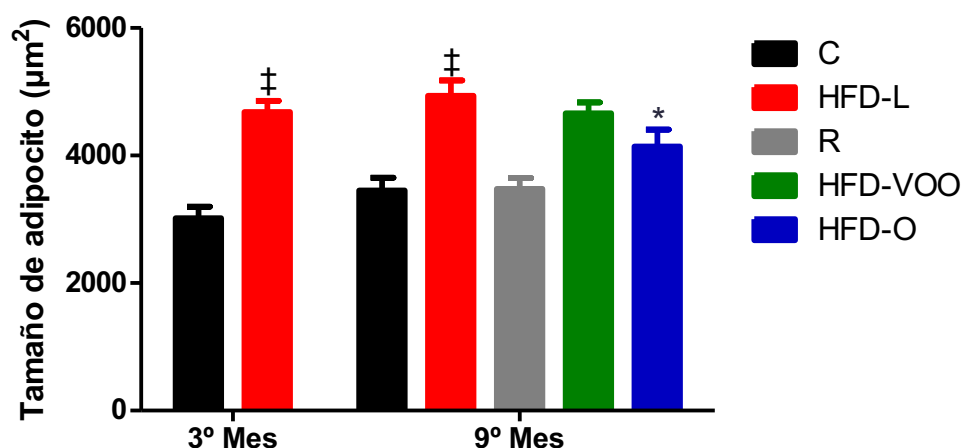


Figura 4.41. Efecto de la dieta HFD a 12 y 36 semanas sobre el tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. A los 3 meses hubo una diferencia significativa ($^{\dagger}p<0,001$) entre HFD-L y el grupo control. A los 9 meses hubo una diferencia significativa ($^{\dagger}p<0,001$) entre HFD-L y los grupos control reversión y entre el grupo HFD-L y HFD-O ($*p<0,05$).

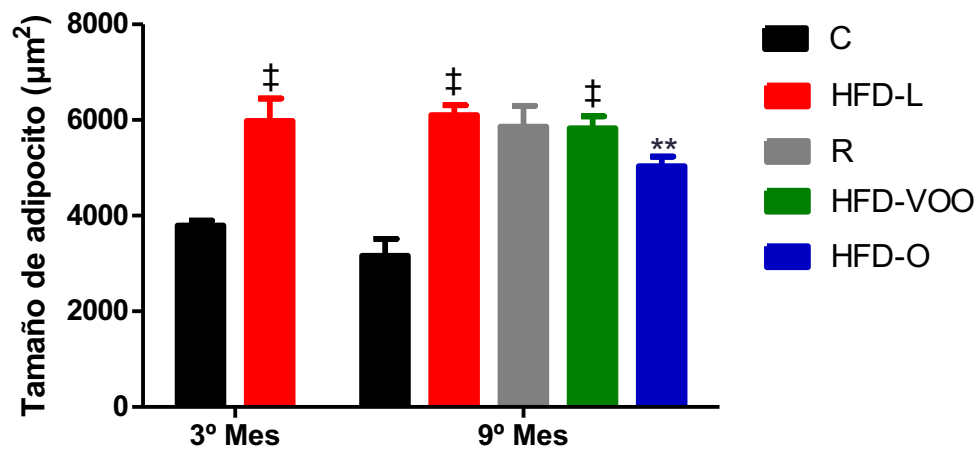
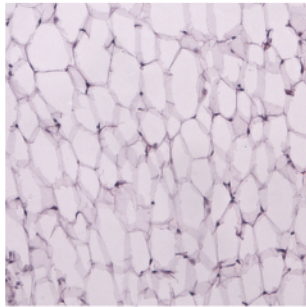


Figura 4.42. Efecto de la dieta HFD a 12 y 36 semanas sobre el tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo epididimal. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. A los 3 meses hubo una diferencia significativa ($^{\dagger}p<0,001$) entre HFD-L y el grupo control. A los 9 meses hubo una diferencia significativa ($^{\dagger}p<0,001$) entre HFD-L y el grupo control y entre el grupo HFD-L y HFD-O ($^{**}p<0,01$).

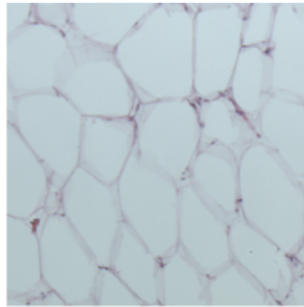
Grasa subcutanea

3 meses

C

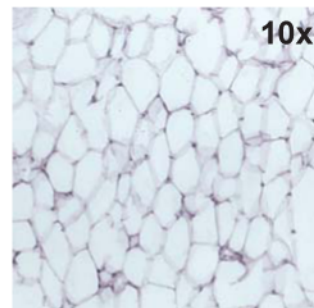


HFD-L

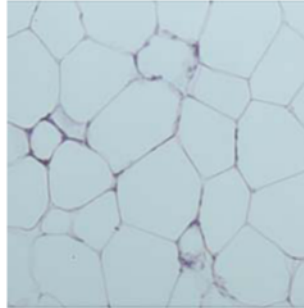


9 meses

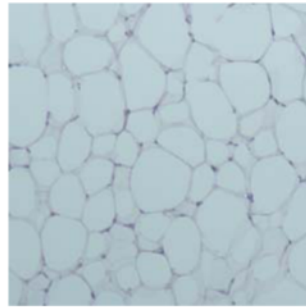
C



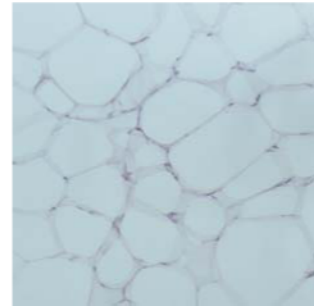
HFD-L



R



HFD-VOO



HFD-O

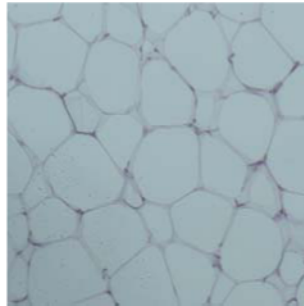
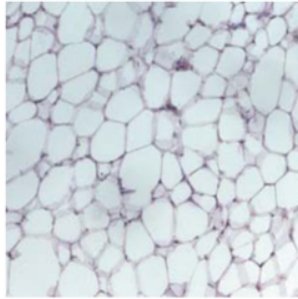


Figura 4.43. Imagen representativa de hematoxilina-eosina mostrando los cortes histológicos de la grasa subcutánea. La magnificación de la imagen fue de 10x.

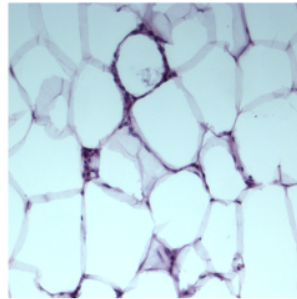
Grasa epididimal

3 meses

C

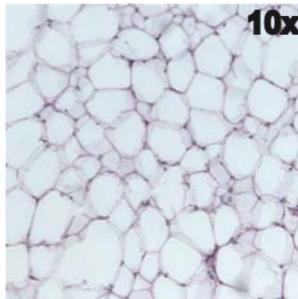


HFD-L

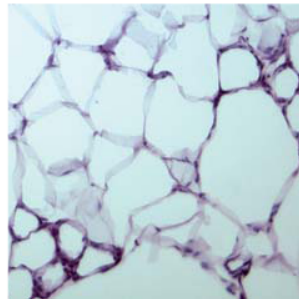


9 meses

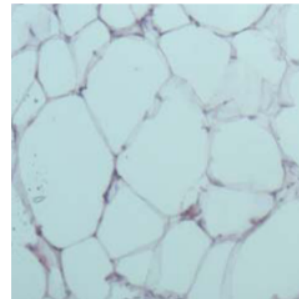
C



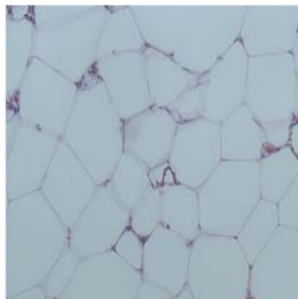
HFD-L



R



HFD-VOO



HFD-O

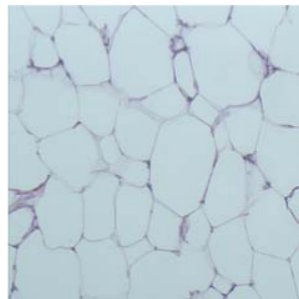


Figura 4.44. Imagen representativa de hematoxilina-eosina mostrando los cortes histológicos de la gras subcutánea. La magnificación de la imagen fue de 10x.

4.5.2 Infiltración de macrófagos en el tejido adiposo subcutáneo y epididimal.

La ingesta de una dieta HFD-L incrementó significativamente ($^{\dagger}p<0,001$) la infiltración de macrófagos a los 3 meses. A los 9 meses, la modificación de la dieta a HFD-O y la vuelta a la dieta control redujeron significativamente la infiltración de macrófagos ($^{**}p<0,01$) (figura 4.45). Con respecto a la grasa epididimal, la dieta HFD-L incrementó significativamente ($^{**}p<0,01$) la infiltración de macrófagos a los 3 meses. A los 9 meses, la modificación del perfil lipídico de las grasas (grupos HFD-VOO y HFD-O), así como la vuelta a la dieta control normalizaron la infiltración de macrófagos (figura 4.46).

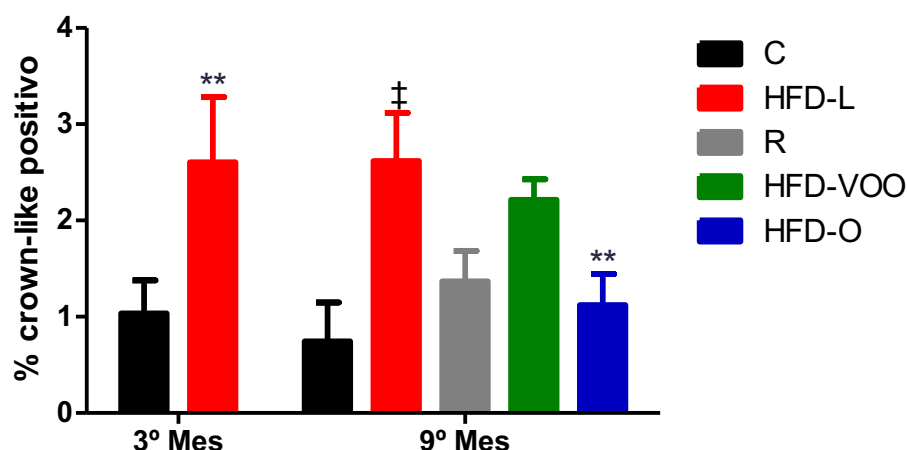


Figura 4.45. Efecto de la dieta HFD a 12 y 36 semanas sobre la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo subcutáneo. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. A los 3 meses hubo una diferencia significativa ($^{**}p<0,01$) entre HFD-L y el grupo control. A los 9 meses hubo una diferencia significativa ($^{\dagger}p<0,001$) entre HFD-L y el grupo control y entre el grupo HFD-L y los grupos HFD-O y reversión ($^{**}p<0,01$).

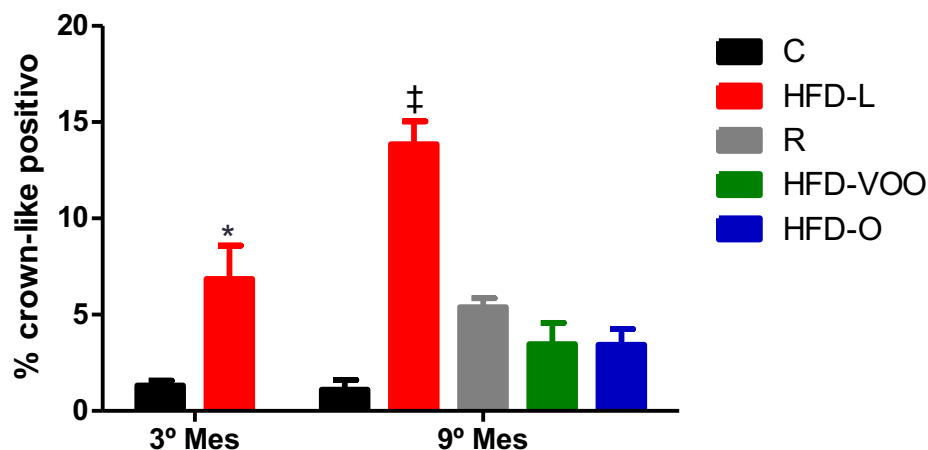


Figura 4.46. Efecto de la dieta HFD a 12 y 36 semanas sobre la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo subcutáneo. Los valores, representan la media \pm SEM de 5 ratones en cada grupo experimental. A los 3 meses hubo una diferencia significativa ($**p<0,01$) entre HFD-L y el grupo control. A los 9 meses hubo una diferencia significativa ($^{\dagger}p<0,001$) entre HFD-L y el resto de los grupos.

4.6 Estudios en tejido hepático.

4.6.1 Expresiones de genes reguladores del metabolismo lipídico.

Hemos analizado la expresión del ARNm, codificado por los genes hepáticos que regulan la homeostasis lipídica, descubriendo que los grupos HFD-VOO y HFD-O tienen una mayor expresión ($*p<0,05$) del transportador CD36 (figura 4.47) y de la adiponutrina (figura 4.48) con respecto al resto de grupos. Además, examinamos la expresión de los receptores PPAR- α , detectando una tendencia de incremento del mismo en el grupo HFD-O, aunque no obtuvimos diferencias significativas con respecto al grupo HFD-L (figura 4.49).

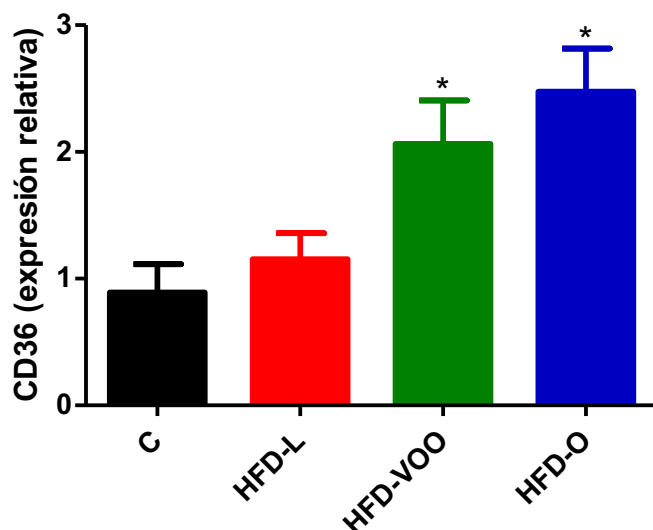


Figura 4.47. Efecto de las dietas HFD a las 36 semanas sobre los niveles de expresión del marcador cd36, en el tejido hepático. Los valores, representan la media \pm SEM de 3 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo C y HFD-L, con respecto a los grupos de aceite de oliva (* $p < 0,05$).

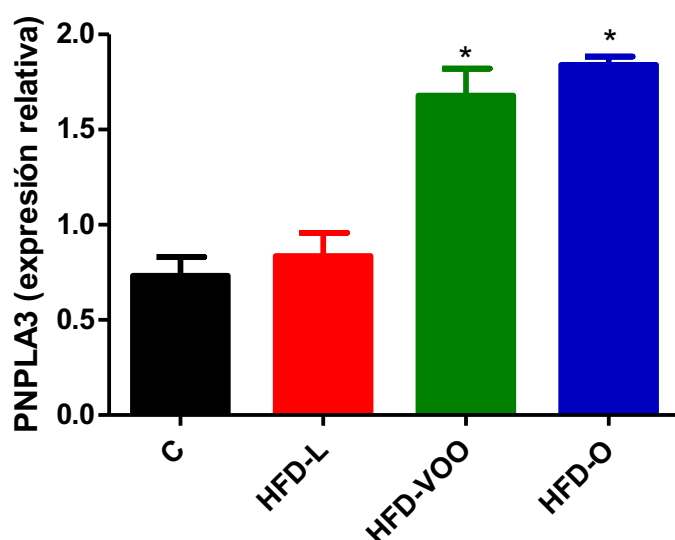


Figura 4.48. Efecto de las dietas HFD a las 36 semanas sobre los niveles de expresión del marcador Pnpla3, en el tejido hepático. Los valores, representan la media \pm SEM de 3 ratones en cada grupo experimental. Se obtuvieron diferencias significativas del grupo C y HFD-L, con respecto a los grupos de aceite de oliva (* $p < 0,05$).

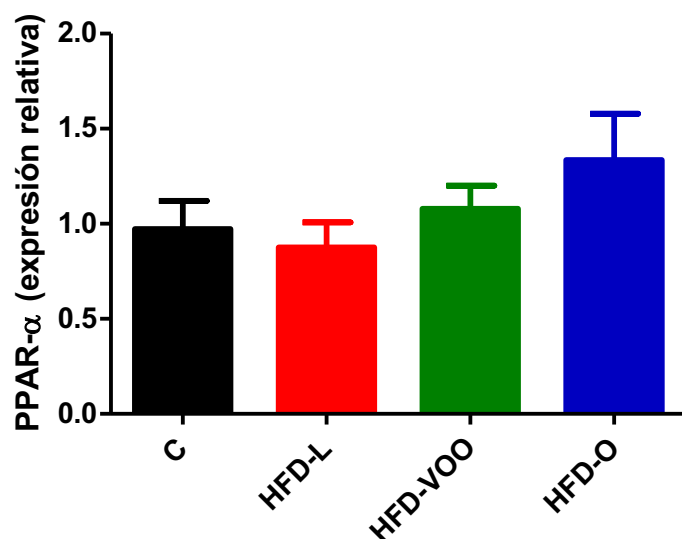


Figura 4.49. Efecto de las dietas HFD a las 36 semanas sobre los niveles de expresión del marcador Ppar- α , en el tejido hepático. Los valores, representan la media \pm SEM de 3 ratones en cada grupo experimental. No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos.

4.6.2 Estudios histológicos hepáticos.

Al final del estudio, se utilizó una puntuación suma de esteatosis hepática, degeneración en globo de la hepatitis e inflamación lobular, denominada índice NAS (Tabla 7) para medir la presencia o ausencia de enfermedad en los hígados teñidos con H & E (Figura 4.50 A). La puntuación de esteatosis en los grupos C y R fue 0, que se considera como la inexistencia de esteatosis hepática. Sin embargo, el grupo HFD-L desarrolló un esteatosis mayor de 4 que se cree que es probable esteatosis hepática no alcohólica. Por último, la puntuación de esteatosis en el grupo HFD-VOO fue de 3, clasificado como en el límite de la esteatosis. En contraste, la puntuación en el grupo HFD-OL fue 2, que se correlaciona con un diagnóstico de inexistencia de esteatosis hepática. La evaluación de la fibrosis hepática por Sirius tinción roja (Figura 4.50 B) no mostró diferencias entre los grupos de HFD. Por último, se observó un aumento significativo ($*p < 0,05$) en la acumulación de lípidos hepáticos en los grupos HFD-L y HFD-VOO en comparación con los grupos control y reversión, que se

redujeron significativamente en el grupo de ratones HFD-O (Figura 4.50, $*p<0,05$).

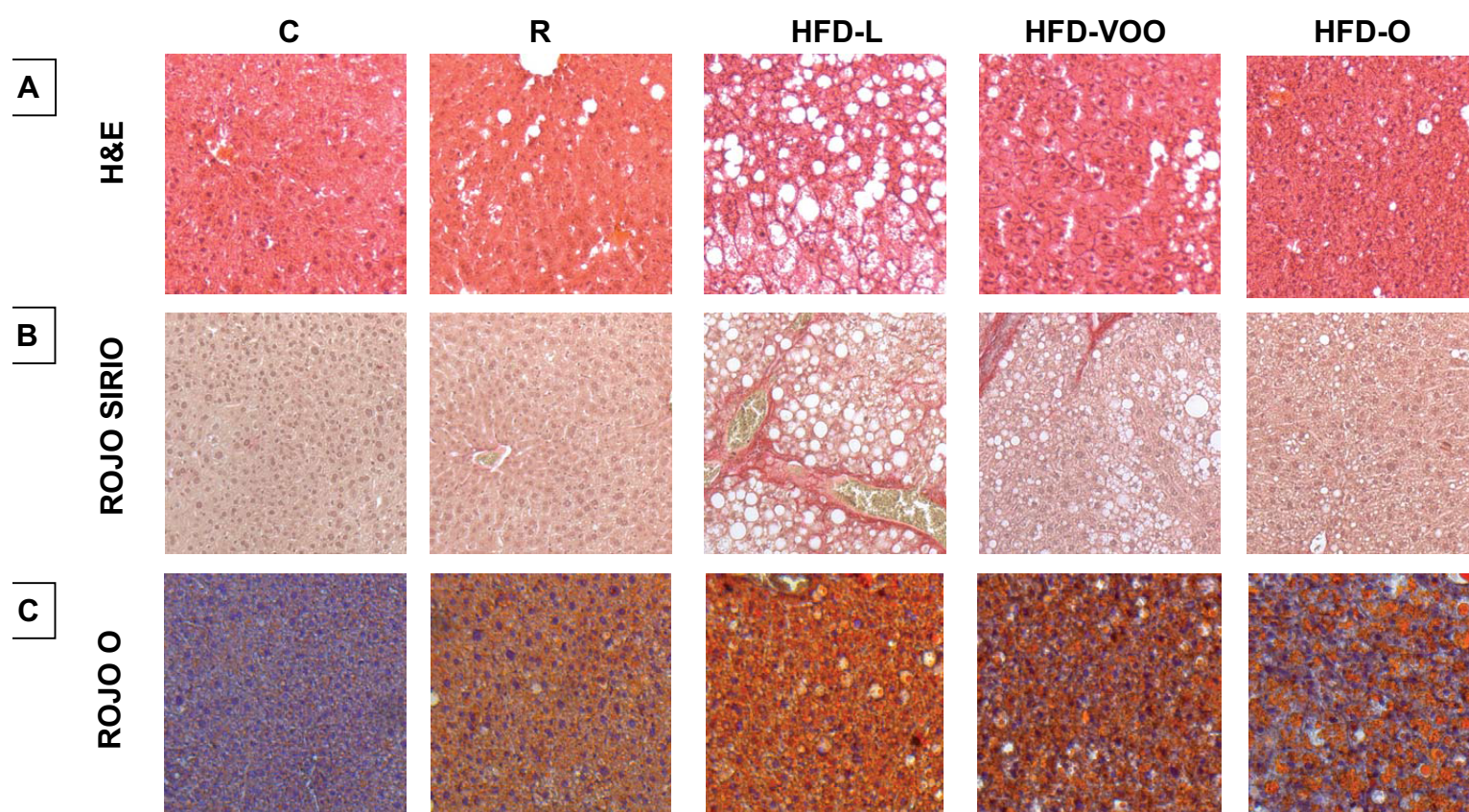


Figura 4.50. Imagen representativa mostrando las tinciones de H&E (A), rojo sirio (B) y rojo O (C) de los animales sometidos a distintas dietas HFD a las 36 semanas. Se muestra una imagen representativa de microscopía con aumento 10x. En la parte superior de los paneles se indican los distintos grupos experimentales de animales.

Características histológicas	C	R	HFD-L	HFD-VOO	HFD-O
Esteatosis (0-3)	0	0	3 ± 0	3 ± 0	1.33 ± 0.44*
Inflamación lobular (0-3)	0	0	1.67 ± 0.44	0.33 ± 0.44	0.67 ± 0.44
Globosidad (0-2)	0	0	0	0	0
Esteatosis no alcohólica	0	0	4.67 ± 0.44	3.33 ± 0.44*	2 ± 0*
Fibrosis (0-4)	0	0	0	0	0
Tinción rojo sirio (%)	0.18 ± 0.02*	0.37 ± 0.11	2.54 ± 0.79	0.62 ± 0.19	0.34 ± 0.09

Tabla 7. Valores medios de esteatosis, inflamación lobular, hepatocitos degenerados con forma globosa, puntuación total de esteatosis no alcohólica de acuerdo con la NASH CRN Scoring system. El valor de la tinción Rojo sirio se expresa como porcentaje de tinción positiva con respecto al total de la superficie de la muestra (n=3. * $p < 0,05$ vs HFD-L).

4.6.3 Estudios de lipidómica.

En este apartado se ha analizado tanto los triglicéridos como los ácidos grasos del hígado. Se observó una disminución significativa del ácido palmitoleico (C16: 1n-7) en los hígados de los grupos HFD-VOO y HFD-O (* $p < 0,05$), que fue acompañada por un aumento significativo del ácido oleico (C18: 1n-9) (** $p < 0,01$) (tabla 8). Este hecho podría estar probablemente relacionado con el aumento del contenido de ácido oleico en la dieta de estos animales, debido a la composición de triglicéridos con dos moléculas de oleico (OO) (tabla 2). Los MUFA totales fueron significativamente mayores en los tres grupos de ratones alimentados con HFD, en comparación con el control C ($^+p < 0,001$) (tabla 8). Este aumento, fue mayor en los grupos HFD-VOO y HFD-O, en comparación con el grupo HFD-L (1,6 y 1,4 veces, en comparación con C). Este hecho probablemente estuvo relacionado con la composición de ácidos grasos de las grasas de la dieta. Además, los grupos HFD-VOO y HFD-O tuvieron proporciones significativamente más bajas (** $p < 0,01$) de ácidos grasos poliinsaturados de

cadena larga de la serie n-6 (C20: 4, C22: 4, C22: 5 n-6 y C22: 6), con respecto a los otros grupos de ratones (tabla 8). El análisis de la acumulación de triglicéridos, reveló que la trioleína (OOO) aumentó 4 veces en hígados de ratones HFD-VOO y HFD-O en comparación con C, y 2 veces en comparación con HFD-L (tabla 9). Del mismo modo, se observó un aumento de 5 veces en la mezcla compuesta por Palmitoleil-dioleil-glicerol y Palmitoleil-oleil-araquidonil-glicerol (PoOO + PoOAs) en hígados de ratones de HFD-VOO y HFD-O, grupos en comparación con C (tabla 9). Además, los triglicéridos compuestos por una combinación de SFA se redujeron significativamente (** $p < 0,01$)) en los grupos HFD-VOO y HFD-O en comparación con C (tabla 9). Por lo tanto, hubo una disminución de hasta 2 veces en la acumulación de 1,3-dipalmitil-linoleil-glicerol (PLP) en comparación con el C. Los cambios observados en la acumulación de lípidos hepáticos, se relacionaron con el contenido de ácidos grasos y triglicéridos en la dieta de estos animales.

Ácidos grasos	C	HFD-L	HFD-VOO	HFD-O
C14:0	n.d.	0.16±0.10	0.15±0.08	0.14±0.09
C14:1	0.45±0.03	0.33±0.08	0.30±0.06	0.29±0.06
C16:0	22.10±0.8	23.54±0.4	20.35±1.2	20.61±0.8
C16:1n-9	0.95±0.06 [*]	1.42±0.14 [*]	2.27±0.19 [*]	2.12±0.12 [*]
C16:1n-7	4.83±0.04 [*]	3.00±0.12 [*]	2.24±0.19 [‡]	2.37±0.19 [‡]
C18:0	3.66±0.05	4.20±0.38	3.41±0.81	3.05±0.34
C18:1n-9	25.63±1.1	42.65±1.8	50.57±1.4	51.27±0.9
C18:1n-7	6.32±0.53 [*]	5.77±0.11 [*]	8.21±1.32 [*]	4.79±0.40 [*]
C18:2n-6	24.44±1.5	10.36±0.5	7.42±0.55 [*]	8.76±0.43 [*]
C18:3n-6	0.77±0.12 [*]	0.32±0.05 [*]	0.13±0.01 [*]	0.22±0.03 [*]
C18:3n-3	0.58±0.01 [‡]	1.05±0.05 [*]	1.44±0.12 [*]	1.26±0.05 [*]
C20:2n-6	0.43±0.04 [*]	0.42±0.02 [*]	0.30±0.04 [*]	0.35±0.02 [*]
C20:4n-6	5.39±0.31 [*]	3.97±0.57 [*]	1.77±0.12 [*]	2.79±0.38 [*]
C22:4n-6	0.31±0.03 [*]	0.26±0.02 [*]	0.09±0.00 [*]	0.14±0.01 [*]
C22:5n-6	0.29±0.02 [*]	0.24±0.02 [*]	0.07±0.01 [*]	0.12±0.02 [*]
C22:5n-3	0.34±0.02 [*]	0.19±0.03 [*]	0.06±0.01 [‡]	0.11±0.02 [*]
C22:6n-3	3.31±0.20 [*]	2.04±0.30 [*]	0.94±0.11 [‡]	1.44±0.23 [*]
Saturados totales	25.76±0.8	27.89±0.7	23.91±2.0	23.80±1.0
Monoinsaturados	38.28±1.5	53.22±2.0	63.66±2.4	60.92±0.8
Poliinsaturados	35.87±2.1	18.84±1.4	12.23±0.7	15.18±1.0

Tabla 8. Niveles de concentración para cada uno de los ácidos grasos identificados en el hígado de los ratones al final de la intervención dietética (g/ 100g ácidos grasos totales). C:14 Ácido Mirístico; C14:1 Ácido Miristoleico; C:16 Ácido Palmítico; C16:1n-9 Ácido Hexadecanoico; C16:1n-7 Ácido Palmitoleico; C18:0 Ácido esteárico; C18:1n-9 Ácido Oleico; C18:1n-7 Ácido Vaccénico; C18:2n-6 Ácido Linoleico; C18:3n-6 Ácido γ -Linolenico; C18:3n-3 Ácido α -Linolenico; C20:2n-6 Ácido Eicosadienoico (EDA); C20:4n-6 Ácido Araquidónico; C22: 4n-6 Ácido Docososaneodronico (DTA); C22:5n-6 Ácido Docosapentaenoico (DPA); C22: 5n-3 DPA; C22:6n-3 Ácido

Docosahexaenoico(DHA). Los valores se expresan como la media \pm SEM, $n=5$; n.d. No detectado. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; † $p<0,001$.

Triglicéridos	C	HFD-L	HFD-VOO	HFD-O
MPP	0.37 \pm 0.10*	0.48 \pm 0.03*	0.70 \pm 0.09*	0.29 \pm 0.02**
PPP	0.14 \pm 0.01*	0.27 \pm 0.04*	0.13 \pm 0.02*	0.12 \pm 0.00**
MLP	0.32 \pm 0.07*	0.24 \pm 0.02*	0.11 \pm 0.05*	0.16 \pm 0.01**
POP	2.85 \pm 0.36†	5.11 \pm 0.18*	4.65 \pm 0.23*	3.62 \pm 0.29**
PAsP	0.35 \pm 0.07	0.39 \pm 0.08	0.23 \pm 0.04	0.38 \pm 0.07
POPo	0.70 \pm 0.10*	1.59 \pm 0.19*	1.93 \pm 0.11*	1.92 \pm 0.06*
PLP	6.85 \pm 0.20*	5.65 \pm 0.22*	3.23 \pm 0.18†	3.59 \pm 0.29†
PoOPo	0.72 \pm 0.11*	0.57 \pm 0.04*	0.40 \pm 0.09*	0.54 \pm 0.02**
PoAsPo	1.77 \pm 0.67*	0.45 \pm 0.05*	0.19 \pm 0.03*	0.32 \pm 0.02**
PLPo	3.26 \pm 0.56*	1.22 \pm 0.22*	0.35 \pm 0.07*	0.58 \pm 0.05**
POS	0.40 \pm 0.04†	1.17 \pm 0.17*	0.89 \pm 0.08*	0.63 \pm 0.07**
POO	14.29 \pm 1.1	31.32 \pm 0.5	35.14 \pm 0.7	32.82 \pm 0.75
POAs	3.67 \pm 0.73	4.92 \pm 0.58	4.13 \pm 0.16	3.87 \pm 0.34
PoOO+PoOAs	1.13 \pm 0.16†	2.75 \pm 0.46*	5.50 \pm 0.12*	5.14 \pm 0.16*
POL	23.62 \pm 1.1	16.36 \pm 1.4	9.21 \pm 0.17†	12.75 \pm 0.40
PAsL	3.28 \pm 0.33*	1.90 \pm 0.27*	0.96 \pm 0.11†	1.33 \pm 0.14**
PoOL	1.72 \pm 0.10*	1.15 \pm 0.01*	0.94 \pm 0.10*	1.52 \pm 0.07*
PLL	12.81 \pm 1.5	2.92 \pm 0.54*	0.98 \pm 0.15*	1.78 \pm 0.10**
PoLL	1.37 \pm 0.21*	0.17 \pm 0.12*	0.06 \pm 0.04*	0.13 \pm 0.01**
SOO	0.71 \pm 0.05†	1.94 \pm 0.08*	2.47 \pm 0.09*	1.98 \pm 0.07**
OOO	3.21 \pm 0.55†	6.75 \pm 0.19*	12.53 \pm 0.1	12.85 \pm 1.03
OOAs	2.02 \pm 0.34*	2.72 \pm 0.18*	3.12 \pm 0.22*	2.93 \pm 0.10**
SOL	0.50 \pm 0.08	0.55 \pm 0.09	0.53 \pm 0.18	0.55 \pm 0.07
OOL	5.29 \pm 0.52*	3.43 \pm 0.16*	2.91 \pm 0.12†	4.62 \pm 0.37**
OAsL	1.86 \pm 0.11*	0.85 \pm 0.06*	0.56 \pm 0.02†	0.79 \pm 0.04**
OLL	3.06 \pm 0.65*	0.53 \pm 0.07*	0.78 \pm 0.62*	0.62 \pm 0.08**
OOX	25.52 \pm 1.6	46.15 \pm 0.8	56.17 \pm 0.7	55.21 \pm 0.66
PXX	72.91 \pm 1.7	73.53 \pm 0.6	62.64 \pm 0.8	63.86 \pm 1.82
LLX	17.24 \pm 2.3	3.62 \pm 0.72*	1.83 \pm 0.75*	2.53 \pm 0.16**

Tabla 9. Niveles de concentración de triglicéridos para cada uno de sus especies moleculares identificadas en el hígado de los ratones al final de la intervención dietética (g/ 100g). MPP Miristil-dipalmitil glicerol; PPP Tripalmitin; MLP 1-miristil-

2-lauril-3-palmitil-glicerol; POP 1,3-dipalmitil-2-oleoil-glicerol; PAsP 1,3-dipalmitil-2-araquidonoil-glicerol; POPo 1-palmitil-2-oleoil-3-palmitoleil-glicerol; PLP 1,3-dipalmitil-lauril-glicerol; PoOPo 1,3-dipalmitoleil-2-oleoil-glicerol; PoAsPo 1,3-dipalmitoleil-2-araquidonoil-glicerol; PLPo 1-palmitil-2-lauril-3-palmitoleil-glicerol; POS 1-palmitil-2-oleoil-3-estearil-glicerol; POO Palmitil-dioleoil-glicerol; POAs 1-palmitil-2-oleoil-3-araquidonoil-glicerol; PoOO+PoOAs Palmitoleil-dioleoil-glicerol+ Palmitil-2-oleoil-3-araquidonoil-glicerol; POL 1-palmitil-2-oleoil-3-linoleil-glicerol; PAsL 1-palmitil-2-araquidonoil-3-linoleoil-glicerol; PoOL 1-palmitoleil-2-oleoil-3-linoleoil-glicerol; PLL Palmitil-dilinoleoil-glicerol; PoLL Palmitoleil-dilinoleoil-glicerol; SOO Estearil-dioleoil-glicerol; OOO Triolein; OOAs 1,2-dioleoil-3-araquidonoil-glicerol; SOL 1-estearil-2-oleoil-3-linoleoil-glicerol; OOL 1,2-dioleoil-3-linoleoil-glicerol; OAsL 1-oleoil-2-araquidonoil-3-linoleoil-glicerol; OLL Oleoil-dilinoleoil-glicerol; OOX, PXX, LLX (O corresponda al Ácido oleico, P a Ácido palmitico, L a Ácido Láurico, y X a cualquier ácido graso). Los valores se expresan como la media \pm SEM, $n=5$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; † $p<0,001$.

4.6.4 Estudios de proteómica y análisis de las rutas de señalización.

Los conjuntos de datos de expresión de proteínas, se analizaron utilizando la herramienta IPA. Los cambios proteicos se expresan, en relación a los valores del grupo HFD-L. Las figuras 3.51 A y B representan la lista de las redes identificadas, las enfermedades principales y los mecanismos biológicos relacionados. La lista de las proteínas analizadas, reveló cuatro redes significativas en cada grupo: tres redes eran comunes a ambos grupos, pero la red con valores más altos era diferente en cada uno de los grupos. Las redes principales, para el grupo HFD-VOO eran el metabolismo de los lípidos, la bioquímica de moléculas pequeñas y el metabolismo de las vitaminas. Sin embargo, para el grupo HFD-OL los principales cambios se produjeron en la morfología celular, el compromiso celular y enfermedad gastrointestinal, con 14 moléculas diferenciales y una puntuación diferencial de 36 entre ambos grupos de aceite de oliva. La puntuación, es la probabilidad de que una colección de proteínas sea igual a otra por casualidad. Una puntuación de 3, indica una probabilidad 1/1000, de que las proteínas de interés que se encuentran en una red no se deban a la casualidad.

El análisis IPA, también agrupa a las proteínas expresadas diferencialmente asociadas por funciones biológicas. En el caso del grupo HFD-VOO, por orden de importancia están el catabolismo de los lípidos, la concentración de los ácidos grasos, colesterol y triacilgliceroles y finalmente el metabolismo de los ácidos grasos (Figura 3.51 A). Para el grupo HFD-O están los errores innatos de metabolismo de los aminoácidos, la hidrólisis de los aminoácidos, las proteínas relacionadas con la fase G2 del ciclo celular, el metabolismo de los componentes de los ácidos nucleicos y las proteínas de la interfase celular (Figura 3.51 B). En la lista de las funciones toxicológicas mas destacadas, en ambos grupos, están las involucradas en procesos de hepatomegalia (con dos moléculas diferenciales y un valor p de $3.58E-03$), seguido por la proliferación de las células estrelladas hepáticas con 1 molécula diferencial y un valor p de $5.51E-02$ (Figura 3.51 C). Las redes de mayor puntuación en el análisis de IPA en los grupos HFD-VOO y HFD-O, están representados en las figuras 3.52 A y B, respectivamente. En la tabla 10 se muestra el listado de proteínas expresadas diferencialmente en los hígados de los ratones, de los grupos HFD-VOO y HFD-O, al final de la intervención nutricional.

A	Top Networks: HFD-EVOO		
	Associated Network Functions		Score
	1. Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Vitamin and Mineral Metabolism		36
	2. Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Cell Signaling		15
	3. Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Infectious Disease		3
	4. Carbohydrate Metabolism, Cancer, Gastrointestinal Disease		3
	Top Bio Functions	p-Value	Molecules
	Catabolism of lipid	3.85E-04	AMACR,CES1,NUDT7
	Concentration of fatty acid	5.91E-03	AMACR,CES1,IDH1
	Concentration of cholesterol	6.63E-03	AMACR,CES1,IDH1
B	Top Networks: HFD-OL		
	Associated Network Functions		Score
	1. Cell Morphology, Cellular Compromise, Gastrointestinal Disease		36
	2. Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Cell Signaling		15
	3. Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Infectious Disease		3
	4. Carbohydrate Metabolism, Cancer, Gastrointestinal Disease		3
	Top Bio Functions	p-Value	Molecules
	Inborn error of amino acid metabolism	2.33E-03	AHCY, ARG1, HGD
	Hydrolysis of amino acids	3.42E-03	AHCY, ARG1
	G2 phase	3.58E-03	AMACR,ARG1
C	Top Tox Functions		
	p-Value	Molecules	
	Hepatomegaly	3.58E-03	AMACR,ARG1
	Proliferation of hepatic stellate cells	5.51E-02	TF

Figura 4.51. Resumen IPA obtenido para las proteínas hepáticas de los grupos HFD-VOO y HFD-O al final de la intervención nutricional. Lista de las 4 redes funcionales asociadas más relevantes, junto con las proteínas que intervienen en las funciones biológicas más importantes para el grupo HFD-VOO (A) y el grupo HFD-O (B). Listado de las funciones toxicológicas más importantes para ambos grupos alimentados con aceite de olive (C). Abreviaturas: AHCY, S-adenosilhomocisteinasa; AMARC, alfa-metilacil-CoA racemasa; ARG1, arginasa 1; Calm1, calmodulina 1; CES1, carboxilesterasa 1; HGD, homogentisato 1,2-dioxigenasa; IDH1, isocitrato deshidrogenasa 1 (NADP+); MDH1, malato deshidrogenasa 1; NUDT7, nudix (nucleosido difosfato unido a X)-tipo 7 modificado y TF, transferrina.

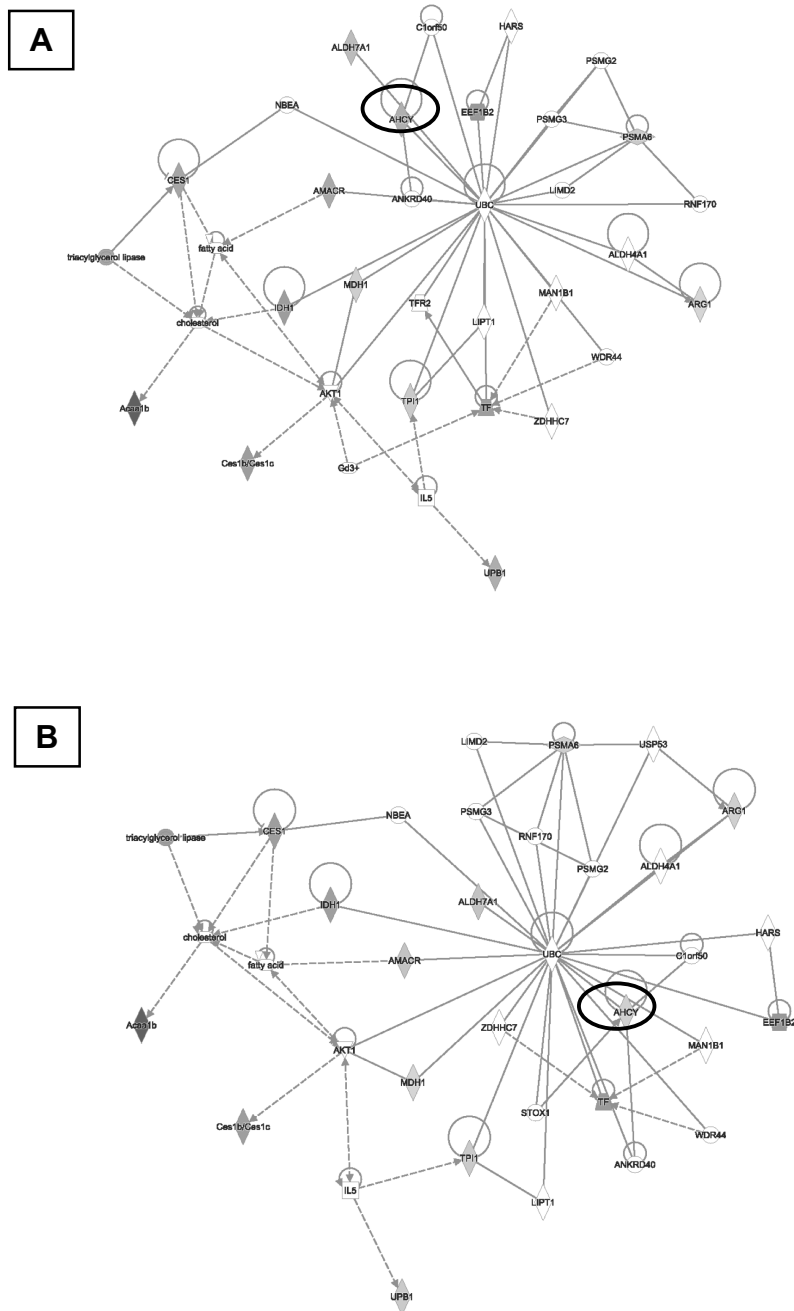


Figura 4.52. Representación de redes de las redes más importantes que aparecen tras el análisis IPA. (A) Grupo HFD-VOO y (B) grupo HFD-O. Las proteínas con símbolos sombreados fueron significativas ($p < 0,05$). Las líneas sólidas indicant una interacción directa entre dos proteínas. Las líneas

punteadas representan una interacción indirecta. Las proteínas con círculos son aquellas que en principio explican el papel de las redes de interacción de proteínas de acuerdo con los efectos biológicos observados en los grupos HFD-VOO y HFD-O. Abreviaturas: ACSM1, acil-coA sintetasa de cadena media familia 1; AHCY, S-adenosilhomocisteinasa; AMARC, alfa-metilacil-CoA racemasa; ARG1, arginasa 1; Calm1, calmodulina 1; CES1, carboxilesterasa 1; HGD, homogentisato 1,2-dioxigenasa; IDH1, isocitrato deshidrogenasa 1 (NADP+); MDH1, malato deshidrogenasa 1; NUDT7, nudix (nucleosido difosfato unido a X)-tipo 7 modificado y TF, transferrina.

UniProtKB	Description	Fold change HFD-EVOO	Fold-change HFD-OL
Q8VCH0	Acetil-Coenzima A aciltransferasa 1B, Acaa1b	4,145	5,285
Q91VA0	Acil-coenzima A sintetasa, ACSM1	0,998	1,504
P50247	Adenosilhomocisteinasa, AHCY	0,999	1,411
Q9DBF1	Aldehido deshidrogenasa familia 7, A1, ALDH7A1	1,61	1,82
Q8VC28	Aldo-keto reductasa familia 1 miembro C13, Akr1c12/Akr1c13	0,748	0,886
O09174	Alfa-metilacil-CoA racemasa, AMACR	2,063	1,789
Q61176	Arginasa-1, ARG1	1,003	1,45
Q8VC97	Beta-ureidopropionato, UPB1	0,959	1,572
M27844.1	Calmodulina, Calm1	0,668	0,792
Q8VCT4	Carboxilesterasa 1, CES1	0,809	0,714
P23953	Carboxilesterasa 1C, Ces1b/Ces1c	0,588	0,751
Q9DBB8	Dihidrodiol deshidrogenasa (dimérica), DHDH	1,336	1,448
Q9DBB8	Dihidrodiol deshidrogenasa (dimérica), DHDH	1,336	1,448
O70251	Factor de elongación 1-beta, E2F1	0,300	0,441
Q8K157	Galactosa mutarotasa (aldosa 1-epimerasa), GALM	1,043	1,284
O09173	Homogentisato 1,2-dioxigenasa, HGD	0,615	0,499
P40936	Indoletilamina N-metiltransferasa, INMT	1,566	1,673
O88844	Isocitrato deshidrogenasa [NADP+] soluble, IDH1	0,565	0,771
P14152	Malato deshidrogenasa 1, NAD (soluble), MDH1	1,145	1,27
Q99P30	(nucleosido difosfato unido a X)-tipo 7 modificado , NUDT7	1,355	1,55
Q9QUM9	Proteosoma subunidad alfa tipo 6, PSMA6	1,25	1,462

Q9QUM9	Proteosoma subunidad alfa tipo-6	1,25	1,462
Q921I1	Serotransferrina	0,638	0,567
P52843	Familia sulfotransferasa, citosolica, 2A, deshidroepiandrosterona (DHEA), m 1, SULT2A1	1,085	1,413
Q921I1	Transferrina, TF	0,638	0,567
P17751	Triosefosfato isomerasa	1,251	1,593
P17751	Triosefosfata isomerasa 1, TPI1	1,251	1,593

Tabla 10. Listado de proteínas expresadas diferencialmente en los hígados de los ratones, de los grupos HFD-EVOO y HFD-O, al final de la intervención nutricional.

V. DISCUSIÓN.

En esta tesis, se analiza la importancia del perfil de las grasas, cuando se sigue una dieta rica en grasas, sobre el tejido hepático, el tejido adiposo y los islotes pancreáticos. También se estudian las consecuencias metabólicas, fundamentalmente el daño inflamatorio, de este tipo de dietas. Para ello, se hacen estudios a nivel fisiológico, histológico, de expresión de genes, lipidómicos y proteómicos, en un intento de encontrar un mecanismo que explique los hallazgos encontrados.

A día de hoy, se sabe que la dieta alta en grasa, es uno de los principales factores que causan anormalidades metabólicas y obesidad, y que la ingesta a largo plazo de dietas altas en grasa, evocan un aumento en el peso corporal y la masa grasa (Ghoneim, Ngo Sock, Lavoie, & Piquette-Miller, 2015). Numerosos estudios se preguntan, si la cantidad de grasa o la procedencia de la misma es el determinante del desarrollo del síndrome metabólico (Priore et al., 2015). Este es uno de los objetivos de la tesis, saber si es posible encontrar ciertos beneficios protectores, a pesar de tomar una dieta hipercalórica e hiperlipémica, sobre el hígado, el tejido adiposo y la homeostasis de la glucosa, cambiando tan solo la procedencia de la grasa, sin disminuir el porcentaje calórico.

En este sentido, buscamos evidencias sobre el posible valor protector de ciertas grasas con respecto a otras, concretamente las grasas monoinsaturadas presentes en el aceite de oliva virgen extra, frente a las grasas saturadas. Por otro lado, dado que el aceite de oliva virgen extra es rico en compuestos fenólicos con poder antioxidante, también se analizó el posible papel de estos compuestos.

Todos los estudios presentados en esta tesis, se realizaron en un modelo animal susceptible de desarrollar síndrome metabólico, en presencia de una dieta rica en grasas, con unas alteraciones muy similares a las que ocurren en las personas cuando ingieren este tipo de dietas. La mayoría de los roedores se vuelven obesos en presencia de dietas ricas en grasas, pero las distintas cepas desarrollan alteraciones diferentes a nivel del daño hepático, el daño

inflamatorio, el estrés oxidativo, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa y la dislipemia. En este sentido, se sabe que la cepa C57BL/6J es la que presenta modificaciones patológicas, en estos parámetros, más parecidas a los humanos (Fellmann, Nascimento, Tibiriça, & Bousquet, 2013). De hecho, se ha visto que ratones C57BL/6 alimentados con una dieta que tiene un porcentaje del 60% de grasas con respecto a la ingesta calórica total desarrollan EGHNA, dislipemia, resistencia a la insulina y disminución de la secreción de insulina (Fraulob, Ogg-Diamantino, Fernandes-Santos, Aguila, & Mandarim-de-Lacerda, 2010). En lo que se refiere a la dieta rica en grasas el estudio ANIBES (Ruiz et al., 2015) (Ramon Estruch et al., 2006) concluyó que los españoles consumen un 38,5% de la ingesta calórica total a partir de las grasas. En nuestro estudio, en vez de utilizar dietas con un porcentaje de grasas del 60% de la ingesta calórica total, que es lo que se suele utilizar en estudios con modelos animales a la hora de desarrollar un síndrome metabólico, preferimos irnos a unos valores de ingestas de grasas los más próximos posibles a los que consumen la población española, usando un 49%.

Así pues, tanto en el modelo animal, como en el modelo de la dieta, tratamos de ajustarnos al máximo a la situación que se puede observar en los pacientes españoles con síndrome metabólico.

Las grasas ingeridas en la dieta pueden influir en el grado de inflamación de diversos procesos agudos y crónicos, ya que modifican la composición de los ácidos grasos de los tejidos. La modificación en la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares y tejidos altera la síntesis y metabolismo de mediadores proinflamatorios de tipo eicosanoide, existiendo de este modo una relación entre la ingesta lipídica y el grado de inflamación en individuos con SM.

En nuestro estudio, se examinó la influencia de la grasa en la dieta en dos etapas de fisiopatología de NAFLD: i) la acumulación de grasa hepática y ii) la respuesta inflamatoria. Usando los datos de 12 semanas de un HFD rico en SFA, desarrollamos un modelo NAFLD que se parecía a la enfermedad humana. Luego, comparamos la progresión de la enfermedad cuando se redujo o reemplazó la fuente de grasa de la dieta. Nuestros resultados sugieren que, el intercambio de SFAs para EVOO en un HFD, reduce significativamente e incluso

reverte la lesión hepática después de iniciada con NAFLD, a pesar de la falta de cambios observados en la expansión del tejido adiposo.

En la fisiopatología del síndrome metabólico (SM) se imbrican alteraciones en el metabolismo glucolipídico, estados proinflamatorios y protrombóticos, relacionados con el sobrepeso. En nuestro estudio el seguimiento, la evolución ponderal y la evolución de la grasa subcutánea, nos marcaron el inicio progresión y/o la reversión del SM en los animales alimentados con las distintas dietas.

Para realizar un proceso similar a la valoración saludable en humanos, nuestro estudio se inició con el control del peso corporal de los animales, una vez cada dos semanas. Durante las 36 semanas, que duró el tratamiento, la dieta HFD-L aumentó significativamente el peso corporal a partir de la segunda semana de tratamiento dietético. Esta diferencia fue aumentando hasta las 12 semanas de tratamiento, momento en el que se modificó su composición lipídica (HFD-VOO y HFD-O), lo que produjo una reducción significativa del peso corporal no encontrándose diferencias significativas con respecto al grupo control.

En ratones con obesidad, es probable que el tejido adiposo sea la fuente inicial de las citoquinas inflamatorias que inciden en los tejidos periféricos, como el hígado. En nuestro estudio se observó que los niveles de citocinas en el plasma y el tejido adiposo siguieron un patrón similar. En el primer caso, INF- γ e IL-6 disminuyeron significativamente cuando la fuente de grasa fue EVOO. En el tejido adiposo, la disminución sólo se observó para INF- γ , aunque el contenido de IL-6 se redujo significativamente cuando los ratones fueron alimentados con un fenólico rico EVOO (OL). Estudios recientes sugieren un posible papel de la IL-6 como una citoquina pro-inflamatoria en el desarrollo de NAFLD en ratones alimentados con HFD. Los cambios de mayor importancia, se produjeron en la capa de tejido adiposo subcutáneo con una importante reducción en ésta. Sin embargo, no se revirtió la hipertrofia adipocitaria. Por lo que podemos concluir, que la procedencia de la grasa no afecta a este proceso.

Uno de los criterios diagnósticos para el síndrome metabólico es la dislipemia, que se caracteriza fundamentalmente por aumento de los triglicéridos,

disminución del HDLc y preponderancia de las LDL pequeñas y densas, defectos que contribuyen de manera significativa al incremento de riesgo de enfermedad cardiovascular en individuos con resistencia a la insulina. Las LDL circulan durante más tiempo en el torrente sanguíneo, y constituyen el principal reservorio de colesterol en el plasma humano. El Consensus report, Jaen (Spain) 2004 y Córdoba (Spain) 2008 señalaron que en estudios epidemiológicos y clínicos el consumo de una Dieta Mediterránea se asocia a mejoría de los principales factores de riesgo cardiovascular, incluyendo el perfil lipídico, la lipemia postprandial, la presión arterial, el peso corporal, la sensibilidad periférica a la acción de la insulina y el metabolismo de la glucosa y el perfil antitrombótico. Además, dicha dieta modula positivamente la función endotelial, la inflamación y el estrés oxidativo. Algunos de estos efectos se atribuyen a los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen, por lo que en la definición de Dieta Mediterránea debería incluirse la presencia de este aceite. (Perez-Jimenez et al., 2005). El mecanismo fisiológico de los efectos hipolipemiantes del consumo de alimentos ricos en componentes fenólicos e insaponificable está aún pendiente de ser dilucidado. Se ha propuesto una mejora del transporte reverso de colesterol, una reducción de la absorción intestinal de colesterol y un incremento de la excreción biliar como base fisiológica de la acción hipolipemiante de la ingesta de alimentos ricos en componentes fenólicos(Rincón-Cervera et al., 2016)(Yang et al., 2013). Las capacidades funcionales de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) reflejan el papel fisiológico de la partícula mejor que la cantidad de colesterol HDL. Una reciente revisión destaca que, en los estudios humanos, el consumo de compuestos fenólicos de aceite de oliva aumentó la capacidad de los HDL para recoger el exceso de colesterol en las células periféricas (la capacidad de eflujo de colesterol). También se ha demostrado que los compuestos fenólicos del aceite de oliva mejoran las capacidades antioxidantes del HDL y algunos rasgos antiinflamatorios. Estos cambios responden a una mejora del estado oxidativo y la composición del HDL(A. Hernáez, Farràs, & Fitó, 2016). La valoración de estas fracciones a lo largo del trabajo ha sido determinante para determinar el estatus metabólico de los animales a la vez que nos indicaban las pautas de los siguientes estudios. Nuestros resultados están de acuerdo con trabajos recientes que indican que el alto porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados, procedentes

principalmente de OO, así como la baja proporción de SAT:MUFA, características de la dieta mediterránea, ejercen efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico en suero (Gillingham, Harris-Janz, & Jones, 2011)(Ros et al., 2014) (Ros et al., 2014). En general, en comparación con dietas altas en SFA, las dietas altas en MUFA tienden a reducir los niveles de triglicéridos en plasma, tanto en pacientes sanos como los que presentan trastornos metabólicos (Gillingham et al., 2011).

Nuestros resultados muestran que se producía una mejora en los niveles de lípidos en sangre en los grupos HFD-VOO y HFD-O. Sin embargo, la disminución de los niveles de colesterol total y colesterol LDL, fueron mayores en el grupo HFD-O que en el grupo HFD-VOO. Además, se observó un aumento más pronunciado en los niveles de HDL en el grupo HFD-O, mientras que no se encontraron diferencias para la reducción de los niveles de triglicéridos entre ambos grupos OO.(Jurado-Ruiz et al., 2017)

Estos resultados concuerdan con un reciente meta-análisis centrado en los ensayos que evalúan los efectos a largo plazo de las dietas bajas en grasa en comparación con las dietas altas en grasa, y que ha demostrado que las dietas bajas en grasa disminuyen los niveles, tanto de colesterol total, como de colesterol LDL, en comparación con la dieta alta en grasa animal (Schwingshackl & Hoffmann, 2013).

Según la bibliografía, el consumo de aceite de oliva virgen rico en componentes menores (como los polifenoles y la fracción insaponificable del aceite de oliva), más específicamente las dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados y ricas en polifenoles, se han asociado con efectos más favorables sobre las concentraciones de colesterol HDL. Este hecho confirma los resultados de numerosos autores que defienden la existencia de una asociación lineal entre las concentraciones de polifenoles en la dieta y el nivel de colesterol HDL. (Covas et al., 2006).(Fernández-Castillejo et al., 2016)(Pedret et al., 2015)(Á. Hernáez, Castañer, Goday, et al., 2017)(Á. Hernáez, Castañer, Elosua, et al., 2017)(Anna Tresserra-Rimbau et al., 2014)(A. Tresserra-Rimbau et al., 2013).

A pesar de esta aseveración parece que las concentraciones de HDL están relacionadas con las concentraciones de oleico, la composición de triglicéridos y su distribución en aceites.

En cuanto a la determinación del estado inflamatorio, los lípidos ingeridos en la dieta pueden influir en el grado de inflamación de diversos procesos agudos y crónicos, ya que modifican la composición de los ácidos grasos de los tejidos, afectando la susceptibilidad a la oxidación de los lípidos que componen las membranas.(Rocío de la Puerta, Marquez-Martin, Fernandez-Arche, & Ruiz-Gutierrez, 2009).

La modificación en la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares afecta y altera la síntesis y metabolismo de mediadores proinflamatorios de tipo eicosanoide, existiendo de este modo una relación entre la ingesta lipídica y el grado de inflamación en determinados procesos.

Los principales compuestos fenólicos de la fracción polar del aceite de oliva virgen (oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol) tienen actividades antioxidantes bien establecidas. La fracción Insaponificable del AO ejerce un efecto favorable en todos estos procesos inflamatorios. El ácido maslínico, el ácido oleanólico, el eritrodiol y el uvaol son triterpenos pentacíclicos, que se encuentran en la fracción no glicérida del aceite de orujo y oliva virgen, tienen propiedades antiinflamatorias muy definidas. El uvaol, el eritrodiol y el ácido oleanólico reducen significativamente la producción de IL-1beta y IL-6 dependiendo de la estructura química y la dosis, y pueden ser útiles en la modulación de la respuesta inmune.(Marquez-Martin, Puerta, Fernandez-Arche, Ruiz-Gutierrez, & Yaqoob, 2006)(R de la Puerta, Martínez Domínguez, Ruíz-Gutiérrez, Flavill, & Hoult, 2001)(R de la Puerta et al., 2001)(R de la Puerta, Martínez-Domínguez, & Ruíz-Gutiérrez, n.d.)(de La Puerta Vázquez, Martínez-Domínguez, Sánchez Perona, & Ruiz-Gutiérrez, 2004)

La modificación de la composición lipídica puede proteger contra el desarrollo de la resistencia a la insulina, al mejorar algunos de los marcadores alterados del síndrome metabólico. De hecho, modificando la composición de la membrana

celular, los aceites dietéticos son capaces de reducir los niveles de glucosa sérica y triglicéridos, aumentando los de colesterol HDL y bajando la presión sanguínea.(Perona et al., 2007)

Estos efectos se deben probablemente a mejoras en la fluidez de la membrana y restauración de la composición lipídica en los microdominios de membrana que están implicados en la actividad de las proteínas de señal. A este respecto, los ácidos grasos SFA y colesterol se asocian usualmente con una mayor rigidez. Sin embargo, todavía existen discrepancias con respecto a los efectos diferenciales de los ácidos grasos individuales. Estas discrepancias son, a menudo, debidas a diferencias en las concentraciones en las que están presentes en la dieta, su longitud de cadena y grado de insaturación, pero también a diferencias en el diseño experimental de los estudios, tales como los diferentes modelos animales utilizados o las diferentes líneas celulares empleadas.(Perona, 2017)

El objetivo de nuestras investigaciones ha sido determinar la posible influencia de una dieta enriquecida en los distintos aceites de oliva virgen, tras la administración de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas.

Nuestro estudio está de acuerdo con las observaciones que aseveran que un aumento de los niveles circulantes de INF- γ e IL-6 como una citoquina proinflamatoria, que contribuye al desarrollo de hígado graso no alcohólico (Berlanga, Guiu-Jurado, Porras, & Auguet, 2014), ya que el bloqueo de la IL-6 protege frente al desarrollo de hígado graso (Yamaguchi et al., 2015).

Este resultado está de acuerdo con otro estudio que ha encontrado una asociación, entre la disminución de INF- γ y la reducción de la esteatosis hepática y la inflamación con la administración de β -glicoesfingolípidos, en un modelo animal de hígado graso no alcohólico (Zigmond et al., 2014), lo que sugiere la participación de un efecto anti-inflamatorio de mediación inmune de OO. En la obesidad, es probable que el tejido adiposo sea la fuente inicial de citoquinas inflamatorias que inciden en los tejidos periféricos, tales como el hígado.

En cuanto a los parámetros inflamatorios en el tejido adiposo epididimal los ratones alimentados con dietas ricas en grasa, el nivel de adipocinas, la distribución del tejido adiposo y el metabolismo de los carbohidratos están influenciados más significativamente por el contenido de lípidos que por la cantidad absoluta de lípidos de la dieta. En un trabajo reciente en ratones C57BL / 6 se sometieron a una dieta de control de 10 semanas (10% de grasa) o una dieta de HF (60% grasa) que contenía manteca de cerdo (HF-L), aceite de oliva (HF-O), aceite de girasol o aceite de canola y se determinaron las hormonas séricas y citocinas. Los niveles plasmáticos de insulina fueron mayores en los grupos HF-L y HF-O que en los otros tres grupos. Los niveles de resistina y la expresión de leptina fueron más altos en los grupos HF-L y HF-O. De los cuatro grupos, la interleucina-6 se expresó al nivel más alto en el grupo HF-L, mientras que la adiponectina se expresó en el nivel más bajo. La acumulación de tejido adiposo subcutáneo y visceral fue mayor en el grupo HF-L en comparación con los otros grupos. Este grupo presentaba hipertrofia de los adipocitos de grasa subcutánea y epididimal (Catta-Preta et al., 2012)

En nuestro estudio observamos, que el patrón inflamatorio en el plasma era el mismo que el obtenido en el tejido adiposo, por lo que sugerimos que el tejido adiposo podría ser la fuente principal de citoquinas en estos ratones obesos, inducido por la dieta de grasa animal.(Jurado-Ruiz et al., 2017)

Basándonos en estos antecedentes bibliográficos y teniendo en cuenta que la obesidad, va acompañada de muerte de los adipocitos y el aumento de la infiltración de macrófagos (Weisberg et al., 2003), decidimos explorar la presencia de macrófagos en estructuras histológicas en forma de corona, en la grasa epididimal de ratones (M. M. Altintas et al., 2011). Gracias a los estudios de histopatología y el acierto de las tinciones escogidas se ha observado un aumento, en la densidad de macrófagos en la grasa epididimal, en ratones obesos con predisposición inducidos por dieta, así como un aumento sustancial en la prevalencia de macrófagos activos en ratones obesos.

De acuerdo con estos resultados, se encontró que los ratones alimentados con una dieta alta en grasa, desarrollaron obesidad y tenían una alta expresión en los factores de transcripciones ligado a macrófagos, así como aumento en el número de macrófagos presentes en la grasa epididimal. Encontramos una reversión de

estos hallazgos, cuando el aceite de oliva oleaster, era la fuente de grasa en los ratones con dietas ricas en grasa. Además, la presencia de compuestos polifenólicos, no tuvo ningún efecto sobre la reversión del estado inflamatorio. Puesto que se ha postulado que la IL-6 influye en el reclutamiento de células inmunes, durante el desarrollo de la hipertensión de la arteria pulmonar (Irwin et al., 2014), creemos que el aumento de IL-6 en la grasa epididimal, induce el reclutamiento y la infiltración de macrófagos que contribuirían en la secreción de esta citoquina proinflamatoria. Corroboramos esta teoría con los estudios de expresión de factores macrofágicos, donde encontramos sobreexpresión en los marcadores de superficie de los macrófagos M1 (F4/80, CD11b y CD11c) en la grasa del epidídimo de ratones HFD-L, estos valores se revirtieron tanto en los ratones HFD-VOO como en los HFD-O. Los macrófagos M1, como vimos en la introducción, son macrófagos activados proinflamatorios, por lo que aumentarían tanto la expresión de genes inflamatorios, como la reactividad hacia los ácidos grasos (Nguyen et al., 2007).

En los últimos años se ha visto que el tejido adiposo, y en especial la grasa visceral, expresa gran cantidad de genes para la secreción de proteínas. Los adipocitos segregan moléculas biológicamente activas, que reciben el nombre de adipocitocinas. Estas moléculas pueden contribuir a la resistencia a la insulina, ya que modulan procesos como secreción y acción de la insulina. En el síndrome metabólico la adipocitocina más importante es la leptina que modula el peso corporal. La mayoría de los estudios sobre la relación entre las concentraciones de leptina HFD, han encontrado una asociación positiva entre la mayor ingesta de grasa y los niveles de esta hormona (Izadi, Saraf-Bank, & Azadbakht, 2014). En nuestro trabajo, aunque se observó una tendencia a disminuir los niveles de leptina en el grupo HFD-O, no se encontraron diferencias entre todos los grupos de ratones HFD. Los estudios de intervención mostraron que, la leptina circulante disminuye después de una pérdida de peso; este estudio apoyaría nuestras conclusiones, ya que hemos observado una reducción paralela de los niveles de peso corporal y la leptina en el grupo R, mientras que no se encontraron diferencias significativas en el resto de los grupos. Esto nos lleva a la conclusión, de que los estudios que proporcionan la evidencia de los efectos de la leptina en poblaciones de hígado graso, son limitados y de baja

potencia. La leptina parece ejercer una doble acción en los modelos experimentales de hígado graso: ejerciendo una posible acción anti-esteatósica, al menos en las etapas iniciales de la enfermedad, y también una acción proinflamatoria cuando la enfermedad y/u obesidad persiste o progresa (Polyzos, Kountouras, & Mantzoros, 2015). Por lo tanto, creemos que las diferencias observadas para la esteatosis, medida en los hígados de los ratones HFD-O, podrían deberse a la menor ganancia de peso observada en este grupo en comparación con HFD-L y HFD-VOO. Además, la leptina se produce como un mecanismo de compensación para limitar la expansión de la masa grasa, ejerciendo un efecto antiesteatósico en el hígado, más allá de un cierto punto que desencadena los efectos proinflamatorios que agravan la esteatosis (Polyzos, Kountouras, Zavos, & Stergiopoulos, 2010) (Hocking et al., 2015).

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD) describe una serie de condiciones causadas por la deposición de grasa dentro de las células hepáticas. El contenido de grasa hepática refleja el equilibrio entre varias vías metabólicas implicadas en la síntesis y eliminación de triglicéridos, como son la lipólisis en el tejido adiposo y la lipogénesis de novo, la esterificación de triglicéridos, la oxidación de ácidos grasos y la síntesis / secreción de lipoproteínas de muy baja densidad en el tejido hepático. En particular, se ha demostrado que la lipogénesis hepática de novo juega un papel significativo en la patogenia de la NAFLD. Es ampliamente conocido que la composición de ácidos grasos de la dieta influye en la lipogénesis hepática junto con otras vías metabólicas. Por lo tanto, la grasa dietética no sólo puede estar implicada en la patogénesis de la esteatosis hepática, sino que también puede prevenir y / o revertir la acumulación de grasa hepática (Ferramosca & Zara, 2014)

La modulación del metabolismo de lípidos hepáticos por ácidos grasos es bastante compleja, implicando una secuencia de eventos moleculares que son interdependientes y regulados en forma cruzada. La progresión de la esteatosis hepática puede provenir del aumento de la captación de FFA, la lipogénesis de novo y la síntesis de triglicéridos, y la disminución de la hidrólisis de triglicéridos y la β -oxidación de ácidos grasos. La secreción reducida de triglicéridos vía VLDL también podría promover la acumulación de lípidos hepáticos. Hallazgos

recientes, obtenidos *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que EVOO y sus fenoles tienen un efecto regulador sobre el metabolismo de los lípidos hepáticos mediante la reducción de la vía lipogénica, atenuando así la esteatosis hepática.(Priore et al., 2015). Nuestros resultados muestran, que la limitación en la ingesta calórica después de 12 semanas (grupo R), puede revertir el hígado graso no alcohólico inducido por HFD en el hígado y que OO, provoca menos daño hepático mientras el tejido adiposo pueda continuar expandiéndose. El hígado graso se caracteriza por la deposición anormal de grasa en el tejido hepático, donde los lípidos se almacenan principalmente en forma de gotas grasas ricas en triglicéridos. De hecho, el aumento de los lípidos del hígado, deriva en una hepatomegalia, evidenciada por el índice de aumento de peso del hígado y las funciones de toxicidad, dadas a conocer por el estudio de las posibles rutas metabólicas (IPA), se observó en todos los ratones alimentados con HFD de nuestro estudio. Aunque los hígados de ratones HFD-O, mostraron el índice más bajo entre peso del hígado/peso total entre los grupos HFD, no se encontraron diferencias debido al contenido de compuestos fenólicos en la OO. De acuerdo con este resultado, diferentes estudios llevados a cabo en modelos animales, sugieren que OO proporciona protección contra la esteatosis hepática hasta cierto consumo de grasa (Priore et al., 2015). En humanos, son múltiples los factores que parecen inducir a la acumulación de lípidos en el hígado de pacientes con hígado graso: el aumento de la entrega de los ácidos grasos del tejido adiposo, el aumento de grasa en la dieta, junto con la lipogénesis y la síntesis de triglicéridos en el hígado, pueden explicar este fenómeno. La composición de lípidos hepáticos confirmó, que las grasas dietéticas son la principal responsable de la mayor acumulación hepática de lípidos observada en nuestro estudio, ya que la composición de lípidos del hígado de ratones refleja que la composición de lípidos de la dieta y los niveles plasmáticos de triglicéridos, fueron similares en todos los grupos de dieta alta en grasa.

El análisis de la composición de ácidos grasos en el hígado de ratones homogeneizados, mostró un aumento significativo en la fracción total de monoinsaturados en los grupos HFD-VOO y HFD-O, con especial importancia el aumento de oleico. Este aumento está directamente relacionado con el mayor contenido de este ácido graso en la dieta de los ratones. La incorporación de ácido oleico en las membranas hepáticas, reduce la hepatotoxicidad inducida por

fármacos y la apoptosis hepática relacionada con el envejecimiento (Lopez et al., 2014). Además, el análisis de las funciones de IPA de toxicidad, mostró que la proliferación de las células estrelladas hepáticas, una de las terapias emergentes para la fibrosis hepática (Delgado et al., 2014), se inhibió en los hígados de HFD-EVOO y ratones HFD-OL. Por lo tanto, nosotros proponemos que la composición de ácidos grasos del hígado, la cual está influenciada por la grasa de la dieta, podría ser uno de los factores determinantes para detener el daño hepático. Que en el caso de Oleaster la protección hepática, venga dada por el mayor contenido en oleico, podría deberse en parte, al mayor contenido fenólico de Oleaster®.

Con respecto a los triglicéridos, se observa que las dietas con aceite de oliva condujeron a un mayor contenido de especies moleculares de trioleína y dioleoacylglicerol en hígado, mientras HFD-L condujo a un aumento de la tripalmitina. De acuerdo con esta tesis, ya existen estudios en animales que demuestran la influencia de la grasa sobre la acumulación lipídica en el hígado (Hussein et al., 2007; Ruiz-Gutiérrez, Pérez-Espinosa, Vázquez, & Santa-María, 1999). Sin embargo, este es el primer trabajo que, habiendo estudiado la composición de triglicéridos de los hígados, sugiere que las trioleínas podrían ser un marcador de consumo de aceite de oliva. Estudios anteriores han demostrado, que el tipo de grasa de la dieta determina la progresión de la enfermedad del hígado graso, alterando el perfil de expresión hepático (Ronis et al., 2012).

Para estudiar el mecanismo de la acumulación hepática de lípidos en estos ratones, se midieron los niveles de ARNm codificados por genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos, encontrándose un aumento notable de Cd36 en HFD-VOO y HFD-O, mientras que la expresión no cambió en HFD-L.

Cd36 juega un papel importante en la facilitación de la absorción de ácidos grasos, así como la esterificación en triglicéridos. Se ha observado un aumento en los niveles hepáticos de ARNm de Cd36, en ratas Zucker obesas con esteatosis hepática de forma concomitante, con un aumento en la absorción de ácidos grasos y contenido de triglicéridos (Buqué et al., 2012). Por el contrario, un estudio previo ha encontrado una reducción de este transportador de ácidos grasos en los pacientes con la citrulinemia de tipo II, una enfermedad que se

acompaña con hepatoesteatosis, en ausencia de consumo de etanol (Komatsu et al., 2015), lo que podría ser la explicación a los niveles inalterados Cd36 en nuestro grupo HFD-L, ya que tenía una puntuación de probable esteatosis hepática. Curiosamente, HFD-VOO y HFD-O también tuvieron un aumento en la expresión de ARNm PNPLA3 en comparación con HFD-L. La expresión PNPLA3, está estrechamente regulada por la ingesta de alimentos y se ha sugerido que desempeña un papel importante en la actuación como hidrolasa de triglicéridos (Polson & Thompson, 2004). Las mutaciones en esta enzima, se ha demostrado que aumentan el contenido de grasa hepática en humanos, mediante la limitación de la hidrólisis de triglicéridos (Rotman et al., 2010). Por lo tanto, el aumento de PNPLA3 puede haber servido para limitar la acumulación de triglicéridos hepática, principalmente en el grupo HFD-O. Se ha demostrado que PNPLA3 muestra una preferencia por los glicerolípidos, en los cuales el grupo ácido es el ácido oleico (Huang, Cohen, & Hobbs, 2011), apoyando nuestros resultados de aumento de la expresión de esta enzima, junto con un aumento en contenido de ácido oleico en los hígados de ratones alimentados con HFD enriquecido en OO. En estudios recientes se ha demostrado que la esteatosis hepática produce un descenso en la expresión de PPAR- α , el principal regulador de la oxidación de ácidos grasos (Giby & Ajith, 2014). Además, los ratones que carecen de PPAR- α desarrollan hígado graso y esteatosis hepática, después de la alimentación con un HFD, más rápido que los ratones de tipo salvaje (Abdelmegeed et al., 2011). Esta podría ser la explicación de la menor acumulación de lípidos observada en los hígados de HFD-O, sugiriendo una mayor velocidad de oxidación del ácido graso en estos ratones.

El análisis proteómico de los hígados de los ratones HFD, reveló una red de interacciones proteicas diferente para los grupos HFD-VOO y HFD-O. Este hecho, podría explicarse por la alta expresión de la hidrolasa S-adenosil y arginasa 1 (ARG1), observada en los ratones del grupo HFD-O. S-adenosilhomocisteína hidrolasa convierte, a la s-adenosil en adenosina y homocisteína, durante el metabolismo de la metionina (Frau et al., 2013). La s-adenosil es un potente inhibidor de las enzimas metiltransferasa, e inhibiría la metilación de muchos componentes del tejido incluyendo proteínas, ADN, ARN, fosfolípidos y otras moléculas pequeñas (E. Altintas & Sezgin, 2004). La

acumulación de cobre hepática asociada con la enfermedad de Wilson, es el resultado de la inhibición de la hidrolasa S-adenosil con elevaciones posteriores de los niveles de S-adenosil, con la consecuente reducción de la metilación del ADN global (Le et al., 2014). Además, los hígados esteatósicos con un estadio avanzado de la enfermedad, reflejan un aumento en la expresión de genes hipometilados, en relación con aquellos con estadio leve (Murphy et al., 2013). Además, la mejora de la metilación del ADN global después de la administración de suplementos de folato, se asoció con disminución en la inflamación de la mucosa gástrica infectada por *Helicobacter pylori* (Gonda et al., 2012). Tomados en conjunto, con las consideraciones expuestas en el presente documento, nuestros resultados sugieren que el metabolismo de la metionina, que afecta el estado de metilación del ADN, podría inducir cambios en la expresión de determinados genes relacionados con el metabolismo lipídico en los ratones de los grupos HFD-VOO y HFD-O. Como se mencionó anteriormente, el análisis mostró que la proteómica ARG1, fue significativamente mayor en el hígado de ratones HFD-O. Debido a que, ARG1 compete con la óxido-nítrico sintetasa por la arginina disponible (DiBello et al., 2010), el aumento de ARG1 debe dar lugar a la disminución de la actividad sintetasa de óxido nítrico, previniendo de posibles lesiones oxidativas. Se requieren estudios adicionales, para determinar la magnitud de los efectos de las modificaciones de metilación relevantes a la lesión hepática, y para examinar la asociación entre el metabolismo de la homocisteína y la respuesta oxidativa que acompañan al aumento de ARG1 en respuesta a la DFH.

Modificar la dieta es crucial, en cualquier intento, de revertir el curso de hígado graso no alcohólico. Nuestro estudio demostró, que la sustitución de grasa de la dieta por Oleaster®, invirtió la esteatosis hepática inducida por HFD en ratones, que se considera el objetivo secundario para el tratamiento NAFDL.

Por otra parte, Oleaster® mejoró el perfil de lípidos en plasma y la expresión de citoquinas, por el tejido adiposo en comparación con el consumo de VOO en ratones con hígado graso no alcohólico.(Rocío de la Puerta et al., 2009)(R de la Puerta et al., 2001)(Martínez-Domínguez et al., 2001)(R de la Puerta et al., n.d.)(R de la Puerta, Ruiz Gutierrez, & Houlst, 1999)

Hay evidencia que indica que los lípidos dietéticos pueden tener efectos positivos sobre las características del síndrome metabólico; los mecanismos y efectos sobre las bases moleculares y estructurales subyacentes al proceso fisiológico son todavía ampliamente desconocidos. El tipo y la cantidad de lípidos dietéticos influyen en la composición lipídica de las membranas celulares y modulan las interacciones con las proteínas implicadas en la regulación de la sensibilidad a la insulina, pero también los procesos asociados con otros componentes del síndrome metabólico como dislipidemia e hipertensión. Los efectos, al menos en parte, están probablemente mediados por la modificación de la composición y propiedades estructurales de las membranas plasmáticas (Barcelo et al., 2009). La composición de los fosfolípidos de la membrana celular se regula por la composición de ácidos grasos de la grasa dietética siendo especialmente sensible a los AGPI n-3, (Haag & Dippenaar, 2005). Por el contrario, el contenido de SFA y MUFA de membrana no es tan dependiente del perfil de ácidos grasos en la dieta, ya que estos ácidos grasos pueden sintetizarse endógenamente. Los estudios en animales y humanos han acumulado una impresionante evidencia para establecer la conexión entre los lípidos de la dieta, los perfiles de lípidos de la membrana y la resistencia a la insulina, con dietas altas de SFA que conducen a la resistencia a la insulina, mientras que las dietas altas en n- N-3 ratio, manteniendo la acción de la insulina a niveles normales. Muchos informes han demostrado que una alta ingesta de SFA dietaria empeora significativamente la resistencia a la insulina, en particular a través de modificaciones en la composición de los fosfolípidos de la membrana celular, incluyendo cambios en las actividades de $\Delta 5$ y $\Delta 9$ desaturasa y la expresión de CD36. En los seres humanos, una actividad reducida de $\Delta 5$ desaturasa se asocia con la resistencia a la insulina (Vessby et al., 2001).

El consumo de aceite de oliva virgen induce cambios significativos en las concentraciones específicas de ácidos grasos en los fosfolípidos de la membrana plasmática de sujetos hipertensos, debido principalmente al aumento de la proporción de ácido oleico. Estos cambios han demostrado mejorar la localización y la actividad de varias proteínas asociadas a la membrana y los procesos relacionados con la regulación de la presión arterial (Alemany et al., 2007)(Alemany et al., 2010). La expresión de la proteína G, implicada en la

transducción de la señal celular y la regulación de la presión arterial, también es modulada por los cambios en los lípidos de la membrana (Escribá, Sánchez-Dominguez, Alemany, Perona, & Ruiz-Gutiérrez, 2003).

VI. CONCLUSIONES.

1. Las dietas hipercalóricas e hiperlipídicas ricas en grasas saturadas producen obesidad, dislipemia, DM2 y EGHNA.
2. La ingestas de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas ricas en grasas MUFAS, provenientes de AOVE, reducen significativamente el incremento del peso corporal y mejoran el perfil lipídico.
3. La ingestas de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas ricas en grasas MUFAS, provenientes de AOVE, mejoran la DM2. Esto se debe a una disminución significativa de la resistencia a la insulina, una mejoría significativa en la secreción de insulina inducida por glucosa y a una reducción significativa de la apoptosis de las células beta pancreáticas.
4. La ingestas de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas ricas en grasas MUFAS, provenientes de AOVE, reducen el daño hepático. Esta mejoría se produce como consecuencia de una modificación en la composición lipídica de los hepatocitos y a un menor daño inflamatorio. También, se produce una activación de las rutas de regeneración y reparación hepática.
5. La ingestas de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas ricas en grasas MUFAS, provenientes de AOVE, no modifican la hiperplasia e hipertrofia de los tejidos adiposos. No obstante, el daño inflamatorio en los mismos es significativamente menor. Eso se traduce, también, en una disminución significativa de las citoquinas proinflamatorias a nivel plasmático.
6. El incremento en las cantidades de compuestos polifenólicos, presentes en el aceite de oliva, solo influyen en la mejoría observada en el perfil lipídico.
7. El perfil de los ácidos grasos presentes en nuestras dietas influyen sobre el daño, que el exceso de su consumo puede ocasionar sobre los tejidos metabólicamente activos.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

- (WHO), W. H. O. (2013). A Global Brief on Hypertension: Silent Killer, Global Public Health Crisis.
- Abdelmegeed, M. A., Yoo, S.-H., Henderson, L. E., Gonzalez, F. J., Woodcroft, K. J., & Song, B.-J. (2011). PPAR α expression protects male mice from high fat-induced nonalcoholic fatty liver. *The Journal of Nutrition*, 141(4), 603–10.
<https://doi.org/10.3945/jn.110.135210>
- Abia, R., Pacheco, Y. M., Perona, J. S., Montero, E., Muriana, F. J., & Ruiz-Gutiérrez, V. (2001). The metabolic availability of dietary triacylglycerols from two high oleic oils during the postprandial period does not depend on the amount of oleic acid ingested by healthy men. *The Journal of Nutrition*, 131(1), 59–65.
- Aleman, R., Navarro, M. A., Vögler, O., Perona, J. S., Osada, J., & Ruiz-Gutiérrez, V. (2010). Olive Oils Modulate Fatty Acid Content and Signaling Protein Expression in Apolipoprotein E Knockout Mice Brain. *Lipids*, 45(1), 53–61.
<https://doi.org/10.1007/s11745-009-3370-y>
- Aleman, R., Perona, J. S., Sánchez-Dominguez, J. M., Montero, E., Cañizares, J., Bressani, R., ... Ruiz-Gutierrez, V. (2007). G protein-coupled receptor systems and their lipid environment in health disorders during aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(4), 964–975.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.024>
- Altintas, E., & Sezgin, O. (2004). S-adenosylhomocysteine hydrolase, S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine: correlations with ribavirin induced anemia. *Medical Hypotheses*, 63(5), 834–7. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.03.031>

- Altintas, M. M., Azad, A., Nayer, B., Contreras, G., Zaias, J., Faul, C., ... Nayer, A. (2011). Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *Journal of Lipid Research*, 52(3), 480–8.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M011338>
- Andreadis, E., Tsourous, G., Tzavara, C., GEORGIOPOULOS, D., KATSANO, P., MARAKOMICHELAKIS, G., & DIAMANTOPOULOS, E. (2007). Metabolic Syndrome and Incident Cardiovascular Morbidity and Mortality in a Mediterranean Hypertensive Population. *American Journal of Hypertension*, 20(5), 558–564.
<https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2006.12.001>
- Azizian, H., Mossoba, M. M., Fardin-Kia, A. R., Delmonte, P., Karunathilaka, S. R., & Kramer, J. K. G. (2015). Novel, Rapid Identification, and Quantification of Adulterants in Extra Virgin Olive Oil Using Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Lipids*, 50(7), 705–718. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4038-4>
- Barbarroja, N., López-Pedraza, R., Mayas, M. D., García-Fuentes, E., Garrido-Sánchez, L., Macías-González, M., ... Tinahones, F. J. (2010). The obese healthy paradox: is inflammation the answer? *Biochemical Journal*, 430(1), 141–149.
<https://doi.org/10.1042/BJ20100285>
- Barcelo, F., Perona, J. S., Prades, J., Funari, S. S., Gomez-Gracia, E., Conde, M., ... Ruiz-Gutierrez, V. (2009). Mediterranean-Style Diet Effect on the Structural Properties of the Erythrocyte Cell Membrane of Hypertensive Patients: The Prevencion con Dieta

- Mediterranea Study. *Hypertension*, 54(5), 1143–1150.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.137471>
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., & Auguet, T. (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7, 221–39.
<https://doi.org/10.2147/CEG.S62831>
- Buqué, X., Cano, A., Miquilena-Colina, M. E., García-Monzón, C., Ochoa, B., & Aspichueta, P. (2012). High insulin levels are required for FAT/CD36 plasma membrane translocation and enhanced fatty acid uptake in obese Zucker rat hepatocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 303(4), E504-14. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00653.2011>
- Cameron, A. J., Shaw, J. E., & Zimmet, P. Z. (2004). The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations.
<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2004.03.005>
- Campia, U., Tesauro, M., & Cardillo, C. (2012). Human obesity and endothelium-dependent responsiveness. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), 561–573. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01661.x>
- Catta-Preta, M., Martins, M. A., Cunha Brunini, T. M., Mendes-Ribeiro, A. C., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Aguila, M. B. (2012). Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. *Nutrition*, 28(2), 212–219.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.05.011>
- Covas, M.-I., de la Torre, R., Fitó, M., Estruch, R., Ros, E., Salas-

- Salvadó, J., ... Camargo, A. (2015). Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), S19–S28. <https://doi.org/10.1017/S0007114515000136>
- Covas, M.-I., Nyyssönen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H.-J. F., Kieseetter, H., ... EUROLIVE Study Group. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145(5), 333–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16954359>
- de la Puerta, R., Marquez-Martin, A., Fernandez-Arche, A., & Ruiz-Gutierrez, V. (2009). Influence of dietary fat on oxidative stress and inflammation in murine macrophages. *Nutrition*, 25(5), 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.10.010>
- de la Puerta, R., Martínez-Domínguez, E., & Ruíz-Gutiérrez, V. (n.d.). Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 55(9–10), 814–9.
- de la Puerta, R., Martínez Domínguez, M. E., Ruíz-Gutiérrez, V., Flavill, J. A., & Hoult, J. R. (2001). Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrergic neurotransmission. *Life Sciences*, 69(10), 1213–22.
- de la Puerta, R., Ruiz Gutierrez, V., & Hoult, J. R. (1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical Pharmacology*, 57(4), 445–9.
- de La Puerta Vázquez, R., Martínez-Domínguez, E., Sánchez Perona, J., & Ruiz-Gutiérrez, V. (2004). Effects of different

dietary oils on inflammatory mediator generation and fatty acid composition in rat neutrophils. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 53(1), 59–65.

de la Torre-Carbot, K., Chavez-Servin, J. L., Jauregui, O., Castellote, A. I., Lamuela-Raventos, R. M., Nurmi, T., ... Lopez-Sabater, M. C. (2010). Elevated Circulating LDL Phenol Levels in Men Who Consumed Virgin Rather Than Refined Olive Oil Are Associated with Less Oxidation of Plasma LDL. *Journal of Nutrition*, 140(3), 501–508.
<https://doi.org/10.3945/jn.109.112912>

Delgado, I., Carrasco, M., Cano, E., Carmona, R., García-Carbonero, R., Marín-Gómez, L. M., ... Rojas, A. (2014). GATA4 loss in the septum transversum mesenchyme promotes liver fibrosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 59(6), 2358–70.
<https://doi.org/10.1002/hep.27005>

Desroches, S., & Lamarche, B. (2007). The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 32(1), 23–32.
<https://doi.org/10.1139/h06-095>

DiBello, P. M., Dayal, S., Kaveti, S., Zhang, D., Kinter, M., Lentz, S. R., & Jacobsen, D. W. (2010). The nutrigenetics of hyperhomocysteinemia: quantitative proteomics reveals differences in the methionine cycle enzymes of gene-induced versus diet-induced hyperhomocysteinemia. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 9(3), 471–85.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M900406-MCP200>

Escribá, P. V, Sánchez-Dominguez, J. M., Alemany, R., Perona, J.

- S., & Ruiz-Gutiérrez, V. (2003). Alteration of lipids, G proteins, and PKC in cell membranes of elderly hypertensives. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 41(1), 176–82.
- Estruch, R., Martínez-González, M. A., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Covas, M. I., ... PREDIMED Study Investigators. (2006). Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145(1), 1–11.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., ... PREDIMED Study Investigators. (2013). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1279–1290. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200303>
- Fellmann, L., Nascimento, A. R., Tibiriça, E., & Bousquet, P. (2013). Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*, 137(3), 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.11.004>
- Fernández-Bergés, D., Cabrera de León, A., Sanz, H., Elosua, R., Guembe, M. J., Alzamora, M., ... Marrugat, J. (2012). Síndrome metabólico en España: prevalencia y riesgo coronario asociado a la definición armonizada y a la propuesta por la OMS. Estudio DARIOS. *Revista Española de Cardiología*, 65(3), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.10.015>
- Fernández-Castillejo, S., Valls, R.-M., Castañer, O., Rubió, L., Catalán, Ú., Pedret, A., ... Solà, R. (2016). Polyphenol rich olive oils improve lipoprotein particle atherogenic ratios and subclasses profile: A randomized, crossover, controlled trial.

Molecular Nutrition & Food Research, 60(7), 1544–54.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201501068>

Ferramosca, A., & Zara, V. (2014). Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World Journal of Gastroenterology*, 20(7), 1746. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i7.1746>

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H., & others. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497–509.

Ford, E. S., Giles, W. H., & Dietz, W. H. (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*, 287(3), 356–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790215>

Frau, M., Feo, F., Pascale, R. M., Llovet, J. M., Bruix, J., Feo, F., ... Friedman, S. L. (2013). Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis. *Journal of Hepatology*, 59(4), 830–841. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.031>

Fraulob, J. C., Ogg-Diamantino, R., Fernandes-Santos, C., Aguila, M. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2010). A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 46(3), 212–223. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.09-83>

Ghoneim, R. H., Ngo Sock, E. T., Lavoie, J.-M., & Piquette-Miller, M. (2015). Effect of a high-fat diet on the hepatic expression of

- nuclear receptors and their target genes: relevance to drug disposition. *The British Journal of Nutrition*, 113(3), 507–16.
<https://doi.org/10.1017/S0007114514003717>
- Giby, V. G., & Ajith, T. A. (2014). Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 6(8), 570–9.
<https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i8.570>
- Gillingham, L. G., Harris-Janz, S., & Jones, P. J. H. (2011). Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*, 46(3), 209–28. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3524-y>
- Gonda, T. A., Kim, Y.-I., Salas, M. C., Gamble, M. V., Shibata, W., Muthupalani, S., ... Tycko, B. (2012). Folic acid increases global DNA methylation and reduces inflammation to prevent Helicobacter-associated gastric cancer in mice. *Gastroenterology*, 142(4), 824–833.e7.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.058>
- Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*, 29(1), 415–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101322>
- Haag, M., & Dippenaar, N. G. (2005). Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 11(12), RA359-67.
- Hernández, Á., Castañer, O., Elosua, R., Pintó, X., Estruch, R., Salas-

- Salvadó, J., ... Fitó, M. (2017). Mediterranean Diet Improves High-Density Lipoprotein Function in High-Cardiovascular-Risk Individuals Clinical Perspective. *Circulation*, 135(7), 633–643. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023712>
- Hernández, Á., Castañer, O., Goday, A., Ros, E., Pintó, X., Estruch, R., ... Fitó, M. (2017). The Mediterranean Diet decreases LDL atherogenicity in high cardiovascular risk individuals: a randomized controlled trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 1601015. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201601015>
- Hernández, A., Farràs, M., & Fitó, M. (2016). Olive oil phenolic compounds and high-density lipoprotein function. *Current Opinion in Lipidology*, 27(1), 47–53. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000261>
- Hernaez, A., Remaley, A. T., Farras, M., Fernandez-Castillejo, S., Subirana, I., Schroder, H., ... Fito, M. (2015). Olive Oil Polyphenols Decrease LDL Concentrations and LDL Atherogenicity in Men in a Randomized Controlled Trial. *Journal of Nutrition*, 145(8), 1692–1697. <https://doi.org/10.3945/jn.115.211557>
- Hocking, S. L., Stewart, R. L., Brandon, A. E., Suryana, E., Stuart, E., Baldwin, E. M., ... Swarbrick, M. M. (2015). Subcutaneous fat transplantation alleviates diet-induced glucose intolerance and inflammation in mice. *Diabetologia*, 58(7), 1587–600. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3583-y>
- Hossain, P., Kavar, B., & El Nahas, M. (2007). Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. *New England Journal of Medicine*, 356(3), 213–215.

<https://doi.org/10.1056/NEJMp068177>

- Huang, Y., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2011). Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(43), 37085–93.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290114>
- Hussein, O., Grosovski, M., Lasri, E., Svalb, S., Ravid, U., & Assy, N. (2007). Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 13(3), 361–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17230603>
- Irwin, D. C., Garat, C. V, Crossno, J. T., MacLean, P. S., Sullivan, T. M., Erickson, P. F., ... Klemm, D. J. (2014). Obesity-related pulmonary arterial hypertension in rats correlates with increased circulating inflammatory cytokines and lipids and with oxidant damage in the arterial wall but not with hypoxia. *Pulmonary Circulation*, 4(4), 638–53. <https://doi.org/10.1086/678510>
- Izadi, V., Saraf-Bank, S., & Azadbakht, L. (2014). Dietary intakes and leptin concentrations. *ARYA Atheroscler*, 10(5). Retrieved from www.mui.ac.ir
- James, W. P. T. (2008). The epidemiology of obesity: the size of the problem. *Journal of Internal Medicine*, 263(4), 336–352.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01922.x>
- Jurado-Ruiz, E., Varela, L. M., Luque, A., Berná, G., Cahuana, G., Martinez-Force, E., ... Martín, F. (2017). An extra virgin olive oil rich diet intervention ameliorates the nonalcoholic steatohepatitis

induced by a high-fat “Western-type” diet in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(3), 1600549.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201600549>

Kaur, J. (2014). A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014, 1–21.

<https://doi.org/10.1155/2014/943162>

Komatsu, M., Kimura, T., Yazaki, M., Tanaka, N., Yang, Y., Nakajima, T., ... Aoyama, T. (2015). Steatogenesis in adult-onset type II citrullinemia is associated with down-regulation of PPAR α . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(3), 473–481.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.011>

Krachler, B., Norberg, M., Eriksson, J. W., Hallmans, G., Johansson, I., Vessby, B., ... Lindahl, B. (2008). Fatty acid profile of the erythrocyte membrane preceding development of Type 2 diabetes mellitus. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 18(7), 503–10.

<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.04.005>

Lavee, S. (2015). El olivo desde el siglo XX hasta el XXI. *Olivae: Revista Oficial Del Consejo Oleícola Internacional*, ISSN 0255-996X, N $^{\circ}$. 121, 2015, Págs. 7-18, (121), 7–18.

Le, A., Shibata, N. M., French, S. W., Kim, K., Kharbanda, K. K., Islam, M. S., ... Medici, V. (2014). Characterization of timed changes in hepatic copper concentrations, methionine metabolism, gene expression, and global DNA methylation in the Jackson toxic milk mouse model of Wilson disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8004–23.

<https://doi.org/10.3390/ijms15058004>

Lopez, S., Bermudez, B., Montserrat-de la Paz, S., Jaramillo, S., Varela, L. M., Ortega-Gomez, A., ... Muriana, F. J. G. (2014). Membrane composition and dynamics: a target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(6), 1638–56.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.007>

Marquez-Martin, A., Puerta, R. D. La, Fernandez-Arche, A., Ruiz-Gutierrez, V., & Yaqoob, P. (2006). Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine*, 36(5–6), 211–217.

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2006.12.007>

Martínez-Domínguez, E., de la Puerta, R., Ruiz-Gutiérrez, V., Darvas, Z., Hegyesi, H., Fitzsimons, C., ... Rivera, E. (2001). Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet. *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 50(2), 102–6.

<https://doi.org/10.1007/s000110050731>

Murphy, S. K., Yang, H., Moylan, C. A., Pang, H., Dellinger, A., Abdelmalek, M. F., ... Diehl, A. M. (2013). Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 145(5), 1076–87.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.047>

Nguyen, M. T. A., Favelyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P. A., Jenn, A., ... Olefsky, J. M. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is

activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 35279–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706762200>

Park, Y.-W., Zhu, S., Palaniappan, L., Heshka, S., Carnethon, M. R., & Heymsfield, S. B. (2003). The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Archives of Internal Medicine*, 163(4), 427–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588201>

Pedret, A., Catalán, Ú., Fernández-Castillejo, S., Farràs, M., Valls, R.-M., Rubió, L., ... Solà, R. (2015). Impact of Virgin Olive Oil and Phenol-Enriched Virgin Olive Oils on the HDL Proteome in Hypercholesterolemic Subjects: A Double Blind, Randomized, Controlled, Cross-Over Clinical Trial (VOHF Study). *PLOS ONE*, 10(6), e0129160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129160>

Perez-Jimenez, F., Alvarez de Cienfuegos, G., Badimon, L., Barja, G., Battino, M., Blanco, A., ... Visioli, F. (2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*, 35(7), 421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2005.01516.x>

Perona, J. S. (2017). Membrane lipid alterations in the metabolic syndrome and the role of dietary oils. *Biochimica et Biophysica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.015>

Perona, J. S., Vögler, O., Sánchez-Domínguez, J. M., Montero, E., Escribá, P. V, & Ruiz-Gutierrez, V. (2007). Consumption of virgin olive oil influences membrane lipid composition and regulates

intracellular signaling in elderly adults with type 2 diabetes mellitus. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(3), 256–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389722>

Polson, D. A., & Thompson, M. P. (2004). Macronutrient composition of the diet differentially affects leptin and adiponutrin mRNA expression in response to meal feeding. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(4), 242–6. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.11.009>

Polyzos, S. A., Kountouras, J., & Mantzoros, C. S. (2015). Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 64(1), 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.012>

Polyzos, S. A., Kountouras, J., Zavos, C., & Stergiopoulos, C. (2010). Adipocytokines in insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease: the two sides of the same coin. *Medical Hypotheses*, 74(6), 1089–90. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.12.028>

Ponholzer, A., Temml, C., Rauchenwald, M., Marszalek, M., & Madersbacher, S. (2008). Is the metabolic syndrome a risk factor for female sexual dysfunction in sexually active women? *International Journal of Impotence Research*, 20(1), 100–104. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901605>

Priore, P., Cavallo, A., Gnoni, A., Damiano, F., Gnoni, G. V., & Siculella, L. (2015). Modulation of hepatic lipid metabolism by olive oil and its phenols in nonalcoholic fatty liver disease. *IUBMB Life*, 67(1), 9–17. <https://doi.org/10.1002/iub.1340>

- Reilly, M. P., & Rader, D. J. (2003). The Metabolic Syndrome: More Than the Sum of Its Parts? *Circulation*, 108(13), 1546–1551. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000088846.10655.E0>
- Rincón-Cervera, M. A., Valenzuela, R., Hernandez-Rodas, M. C., Marambio, M., Espinosa, A., Mayer, S., ... Videla, L. A. (2016). Supplementation with antioxidant-rich extra virgin olive oil prevents hepatic oxidative stress and reduction of desaturation capacity in mice fed a high-fat diet: Effects on fatty acid composition in liver and extrahepatic tissues. *Nutrition*, 32(11–12), 1254–1267. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.04.006>
- Rodríguez-Gutiérrez, G., Duthie, G. G., Wood, S., Morrice, P., Nicol, F., Reid, M., ... de Roos, B. (2012). Alperujo extract, hydroxytyrosol, and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin E-deficient rats—a proteomics and network analysis approach. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(7), 1131–1147. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100808>
- Ronis, M. J. J., Baumgardner, J. N., Marecki, J. C., Hennings, L., Wu, X., Shankar, K., ... Badger, T. M. (2012). Dietary fat source alters hepatic gene expression profile and determines the type of liver pathology in rats overfed via total enteral nutrition. *Physiological Genomics*, 44(22), 1073–89. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00069.2012>
- Ros, E., Martínez-González, M. A., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., Fitó, M., Martínez, J. A., & Corella, D. (2014). Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 5(3), 330S–6S.

<https://doi.org/10.3945/an.113.005389>

Rotman, Y., Koh, C., Zmuda, J. M., Kleiner, D. E., Liang, T. J., & NASH CRN. (2010). The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(3), 894–903.

<https://doi.org/10.1002/hep.23759>

Ruíz-Gutiérrez, V., Muriana, F. J., Guerrero, A., Cert, A. M., & Villar, J. (1996). Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. *Journal of Hypertension*, 14(12), 1483–90. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8986934>

Ruiz-Gutiérrez, V., Pérez-Espinosa, A., Vázquez, C. M., & Santa-María, C. (1999). Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *The British Journal of Nutrition*, 82(3), 233–41. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655970>

Ruiz, E., Ávila, J., Valero, T., del Pozo, S., Rodriguez, P., Aranceta-Bartrina, J., ... Varela-Moreiras, G. (2015). Energy Intake, Profile, and Dietary Sources in the Spanish Population: Findings of the ANIBES Study. *Nutrients*, 7(6), 4739–4762.

<https://doi.org/10.3390/nu7064739>

Salas-Salvado, J., Bullo, M., Babio, N., Martinez-Gonzalez, M. A., Ibarrola-Jurado, N., Basora, J., ... PREDIMED Study Investigators. (2011). Reduction in the Incidence of Type 2

Diabetes With the Mediterranean Diet: Results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care*, 34(1), 14–19. <https://doi.org/10.2337/dc10-1288>

Sánchez-Muniz, F. J. (2007). Aceite de oliva, clave de vida en la Cuenca Mediterránea. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, ISSN 0034-0618, ISSN-E 1697-428X, N°. 4 3, 2007, Págs. 653-692, (3), 653–692.

Schwingshackl, L., & Hoffmann, G. (2013). Comparison of effects of long-term low-fat vs high-fat diets on blood lipid levels in overweight or obese patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(12), 1640–61. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.07.010>

Tai, M. M. (1994). A Mathematical Model for the Determination of Total Area Under Glucose Tolerance and Other Metabolic Curves. *Diabetes Care*, 17(2). Retrieved from <http://care.diabetesjournals.org/content/17/2/152>

Tesauro, M., & Cardillo, C. (2011). Obesity, blood vessels and metabolic syndrome. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 203(1), 279–86. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02290.x>

The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. (n.d.). Retrieved from https://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf

Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M. A., Covas, M. I., Corella, D., ... Lamuela-Raventós, R. M. (2013). Dietary intake and major food sources

of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(10), 953–959.

<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2012.10.008>

Tresserra-Rimbau, A., Rimm, E. B., Medina-Remón, A., Martínez-González, M. A., López-Sabater, M. C., Covas, M. I., ... PREDIMED Study Investigators. (2014). Polyphenol intake and mortality risk: a re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC Medicine*, 12(1), 77. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-77>

van Dam, R. M., Willett, W. C., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., & Hu, F. B. (2002). Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care*, 25(3), 417–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874924>

Vessby, B., Uusitupa, M., Hermansen, K., Riccardi, G., Rivellese, A. A., Tapsell, L. C., ... KANWU Study. (2001). Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia*, 44(3), 312–9.

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796–808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>

Yamaguchi, K., Nishimura, T., Ishiba, H., Seko, Y., Okajima, A., Fujii, H., ... Itoh, Y. (2015). Blockade of interleukin 6 signalling ameliorates systemic insulin resistance through upregulation of glucose uptake in skeletal muscle and improves hepatic

steatosis in high-fat diet fed mice. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 35(2), 550–61. <https://doi.org/10.1111/liv.12645>

Yang, F., Zhang, Y., Xu, Q., Li, R., Yang, X., Liu, Y., ... Xue, C. (2013). [Effects of oils on lipid metabolism in obese C57BL/6J mice induced by a high fat diet]. *Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research*, 42(6), 901–6, 914.

Zazpe, I., Sanchez-Tainta, A., Estruch, R., Lamuela-Raventos, R. M., Schröder, H., Salas-Salvado, J., ... Martinez-Gonzalez, M. A. (2008). A large randomized individual and group intervention conducted by registered dietitians increased adherence to Mediterranean-type diets: the PREDIMED study. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(7), 1134–44; discussion 1145. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.04.011>

Zigmond, E., Tayer-Shifman, O., Lalazar, G., Ben Ya'acov, A., Weksler-Zangen, S., Shasha, D., ... Ilan, Y. (2014). β -glycosphingolipids ameliorated non-alcoholic steatohepatitis in the *Psammomys obesus* model. *Journal of Inflammation Research*, 7, 151–8. <https://doi.org/10.2147/JIR.S50508>

